



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



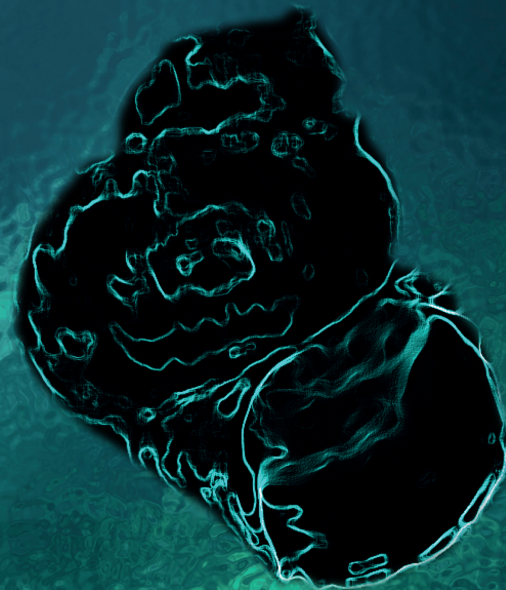
CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

mncn
MUSEO NACIONAL DE CIENCIAS NATURALES

UAM
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID

Avances en el catálogo mitogenómico de Mollusca. Estructura génica y relaciones filogenéticas de Caenogastropoda David Osca

Avances en el catálogo mitogenómico de Mollusca. Estructura génica y relaciones filogenéticas de Caenogastropoda



David Osca Ferriol

Avances en el catálogo mitogenómico de Mollusca.

Estructura génica y relaciones
filogenéticas de Caenogastropoda

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA EVOLUTIVA Y
DIVERSIDAD

Memoria presentada por
David Osca Ferriol

Para optar al grado
de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid

Directores:

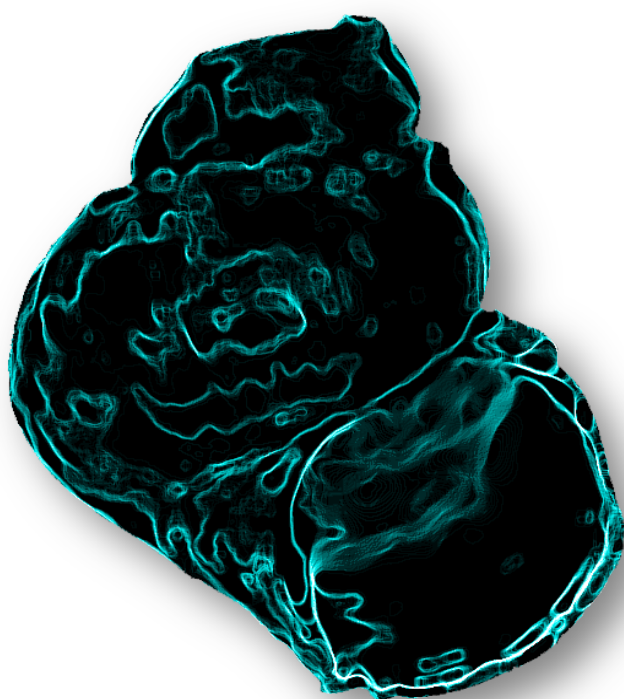
Rafael Zardoya San Sebastián

José Templado González

Tutor:

Ángel Antonio Luque del Villar

Madrid, 2015





Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva
Museo Nacional de Ciencias Naturales
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Departamento de Biología
Facultad de Ciencias

Avances en el catálogo mitogenómico de Mollusca. Estructura génica y relaciones filogenéticas de Caenogastropoda

Memoria presentada por DAVID OSCA FERRIOL para optar al grado de Doctor
en Ciencias Biológicas

VºBº del director de tesis
Dr. Rafael Zardoya San Sebastián

VºBº del director de tesis
Dr. José Templado González

VºBº del tutor de tesis
Dr. Ángel Antonio Luque del Villar

Madrid, 2015

A mis padres, Rubén, Ana, María y Carlos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar estos agradecimientos van dirigidos a Rafa y Pepe, mis directores. Por haberme dado la oportunidad de saber lo que es estar trabajando codo con codo con gente tan excelente como vosotros. Sin vuestra ayuda y dirección esto no habría salido adelante. Me habéis enseñado, escuchado, corregido y orientado. Pero sobretodo, habéis tenido infinita paciencia conmigo y mis errores. Muchas gracias.

También a mi tutor Ángel Luque, porque siempre ha tenido palabras de ánimo y se ha preocupado por cómo ha ido todo siempre. Ofreciéndose a ayudarme en todo lo que estuviera en su mano.

Dar las gracias también, de una forma especial, a Nacho y Paloma, Carolina y Mario, que me han ayudado y apoyado en los momentos más delicados aunque yo no fuera su becario. Siempre con la mano tendida y dispuestos a ofrecerme cualquier cosa que necesitase.

A mis amigos y compañeros. Irisarri, por aguantarme y soportar el bombardeo de preguntas al que te sometí día tras día. Silvi y Lourdes, tres cuartos de lo mismo, aunque sin obligarme a leer el manual. Siempre dispuestas. Cuánto he aprendido y sigo aprendiendo de vosotras. Gracias por estar siempre accesibles. Trabajar a vuestro lado siempre ha sido un placer.

Miriam, gracias por ofrecerme lo que he necesitado en cada momento: un techo, una distracción, una persona que escuchara,... en definitiva, una amiga. A ambas, a Silvi y a ti, mucha fuerza con la tesis que ya la tenéis también a la vuelta de la esquina.

Fede, poco puedo decir de ti que la gente no sepa. Una persona sencilla, buena y con una mente privilegiada. Siempre con ganas de ayudar y con fuerzas para soportar mis infinitas preguntas y críticas a tus programas. Gracias amigo.

Ivanovich y Georgie. Gracias por estar siempre listos para escuchar, ayudar y echarse unos tragos, o unos largos. Gracias Iván por adoptarme desde el segundo día. El primero se lo tengo que conceder a Raquel, ayudándome en todo y enseñándome a manejar en un laboratorio de molecular.

Marina, fueron pocos meses por desgracia, pero fueron mis primeros meses, esos en los que más ayuda y consejos necesita uno. Cuánto de ambas cosas Marina. Muchas gracias.

A Cristina, desde Noruega hasta la Autónoma. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado y todos los consejos que me has dado.

A todo el despacho Z-418. Cómo se puede juntar tanta sabiduría, buena gente, simpatía y compañerismo en tan pocos metros cuadrados. Siempre dispuestos a ayudar, aconsejar, discutir de ciencia, filosofía o para salir de muestreo o cañas. Da igual, siempre dispuestos. Gracias a Iñigo, Buckley, Ernesto y Mario.

A ti Guaci, que aunque haya compartido menos tiempo contigo también has sido muy importante y has estado cuando lo he necesitado. Muchas gracias y, por mucho que me digas que se llama Lucas, para mí siempre será Little John.

Marta, compartimos la pasión por el mar y los moluscos, y siempre has tenido palabras de ánimo y preocupación por mi tesis y mi vida personal. Gracias de corazón.

Por su ayuda y compañía en el día a día a Etienne, Juanes, Paloma, Goyo, Raquel, Patricia, Diushi, Michel, Luis, Virginia, Pau, Violeta, Anna, Diana, Noemi, Fafa, Dani y Jorge. Gracias por dejarme compartir estos años con vosotros.

Tampoco quiero que se olviden Fernando Alda, Patri, The Mexicans, Carlos Toledo, Chiara, Rodo, Anabela, Regina, Teresa y Diego. Cuantas risas, consejos y buenos momentos.

También a Piluchi, Isabel, Yolanda y Ricardo siempre en el labo dando el callo.

A la gente de Noruega: Christoffer Schander, Christiane Todt, Christoph Noever, Henrik Glenner, Hans Tore Rapp, Ken Halanych, Tore Høisaeter, Kenneth Meland, Solveig, Bernt, Louise Linblom, Manuel Malaquias and Andreas Hejnol. Thank you very much.

Pestuzos. ¡Que gente! Este grupo me ha sacado de la rutina de la tesis 5 minutos todos los días... como se agradece.

A Borja, Marta, Patrick, Annie, Rafa, Javi, Lola, Teresa, Pepe Fernández, Manuel, Marian, Isabel Rey, Beatriz, Isabel Morón, Piluka, Américo, Javier Guallart y Alberto Martínez con tiempo siempre para unas cañas, charlar o ayudar con cualquier cosa. Pepe, gracias por ayudarme con la maquetación de los papers.

Y ya fuera del museo a mi familia, por intentar entender lo que es una tesis y ayudarme y apoyarme incondicionalmente desde el principio. Gracias por estar ahí siempre. Especialmente mis padres, mi hermano Rubén, Ana, María y Carlos, a los que he dedicado este trabajo, a mis tíos Marinin y Toni, mi tía Reme y mis primos y sobrinos.

A la familia Fernández-Despiau, por apoyarme siempre y hacerme sentir como uno más de la familia. Gracias.

A Jame, Choli, Nacho, Marta, Sergio, María y Alejandro, Chema, Mariajo, Amparo, Alex y Raúl por preocuparos siempre. A la gente del Grepo: GiseM, Juan Carlos, Gotxon y Yolipiña. Y sobre todo a Nadia por estar todos los días.

A Noelia por ayudarme a centrarme y redirigir mis esfuerzos a conseguir terminar.

A Mandita, Ana, Aitana y Fran. En especial a Mandita, preocupada siempre por mi y con la que he compartido tantos momentos. A vosotros cuatro gracias.

También a la Universidad Católica de Valencia e HIDTMA-ECOMAR por introducirme en el mundo de los poliquetos y moluscos, y en definitiva, llevarme a estar presentando esta tesis. Especialmente, José Tena, Javier Torres, Javier Alcántara, Lola, Carolina, Germán, Nacho Giner, Gilberto, Alejo, Jorge y Calixto.

Y por último, a vosotros Pili y Rafa, que me disteis la primera oportunidad en el mundo de la investigación marina. Por confiar en mi desde el primer momento como alumno interno en histología y fisiología vegetal, en el cultivo in vitro y en tantas cosas que jamás hubiera imaginado y que me sirvieron para poder llegar hasta aquí. Gracias por seguir apoyándome y confiando en mi. Como no, este agradecimiento va dirigido también a los Fefos.

Esta tesis ha sido realizada gracias al Ministerio de Ciencia e Innovación a través de una beca predoctoral FPI (BES-2008-009562) y a los proyectos de investigación concedidos a Rafael Zardoya (CGL2007-60954 Y CGL2010-18216).

Gracias a todos

AGRADECIMIENTOS	7
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	15
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. LOS GASTROPODA	19
1.1.1. SISTEMÁTICA Y FILOGENIA TRADICIONAL	19
1.1.2. LAS FILOGENIAS MOLECULARES	26
1.2. MITOGENÓMICA	29
1.3. REGISTRO FÓSIL, ORIGEN DE LOS DISTINTOS LINAJES Y RELOJES MOLECULARES	36
1.4. COLONIZACIÓN DE LOS HÁBITATS QUIMIOAUTÓTROFOS	41
1.5. LOS APLACOPHORA Y EL HIPOTÉTICO MITOGENOMA DEL MOLUSCO ANCESTRAL	44
1.6. LOS CAENOGASTROPODA	45
1.6.1. CLASIFICACIÓN Y FILOGENIA (RELACIONES INTERNAS)	46
1.6.2. ORIGEN Y REGISTRO FÓSIL DE LOS CAENOGASTROPODA	50
1.6.3. RELACIONES EXTERNAS DE LOS CAENOGASTROPODA	53
2. OBJETIVOS	57
3. RESULTADOS	63
3.1. PUBLICACIÓN 1: THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF <i>SCUTOPUS VENTROLINEATUS</i> (MOLLUSCA: CHAETODERMOMORPHA) SUPPORTS THE ACULIFERA HYPOTHESIS	63
3.2. PUBLICACIÓN 2: THE MITOCHONDRIAL GENOME OF <i>IFREMERIA NAUTILEI</i> AND THE PHYLOGENETIC POSITION OF THE ENIGMATIC DEEP---SEA ABYSOCHRYSOIDEA (MOLLUSCA: GASTROPODA)	75
3.3. PUBLICACIÓN 3: CAENOGASTROPOD MITOGENOMICS	87
4. DISCUSIÓN	103
4.1 EVOLUCIÓN DEL ORDENAMIENTO DEL GENOMA MITOCONDRIAL EN MOLLUSCA, GASTROPODA Y CAENOGASTROPODA	103
4.1.1 REORDENAMIENTOS EN EL GENOMA MITOCONDRIAL DE LOS MOLLUSCA	103
4.1.2 REORDENAMIENTOS DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE LOS GASTROPODA	105
4.1.3 REORDENAMIENTO DEL GENOMA MITOCONDRIAL EN LOS CAENOGASTROPODA	106
4.2 RELACIONES FILOGENÉTICAS DE MOLLUSCA, GASTROPODA Y CAENOGASTROPODA	107
4.2.1 FILOGENIA DE LOS MOLLUSCA	108
4.2.2 FILOGENIA DE LOS GASTROPODA	115
4.2.3 FILOGENIA DE LOS CAENOGASTROPODA	116
4.3 RELOJ MOLECULAR: TIEMPOS DE DIVERGENCIA	122
5. CONCLUSIONES	127
6. BIBLIOGRAFÍA	133
7. APÉNDICES	147
7.1. RESUMEN DE LOS PRINCIPALES CLADOS Y GRUPOS (BOUCHET Y ROCROI, 2005)	147
7.2. APÉNDICE PUBLICACIÓN 1	148
7.3. APÉNDICE PUBLICACIÓN 2	154
7.4. APÉNDICE PUBLICACIÓN 3	155

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	DNA ribosomal
AIC	Criterio de información de Akaike
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
atp6,atp8	Genes mitocondriales que codifican para las subunidades 6 y 8 de la ATPasa mitocondrial
BI	Inferencia bayesiana
pb	Pares de bases
<i>cob</i>	Gen mitocondrial que codifica para el citocromo b
<i>cox1-3</i>	Genes mitocondriales que codifican para las subunidades 1, 2 y 3 de la citocromo oxidasa
dNTP	Desoxirribonucleótidos Trifosfato
<i>H3</i>	Gen nuclear que codifica para la histona 3
KARNI	Cluster de genes codificantes de tRNAs que incluye <i>trnK</i> , <i>trnA</i> , <i>trnR</i> , <i>trnN</i> y <i>trnI</i>
Kb	Kilobases
LBA	Atracción de ramas largas
Ma	Mega annum (millones de años)
MgCl ₂	Cloruro magnésico
MgSO ₄	Sulfato magnésico
ML	Máxima verosimilitud
μM	Micromolar
mM	Milimolar
mt	Mitocondrial
<i>nad1-6</i>	Genes que codifican para las subunidades 1-6 y 4L de la NADH deshidrogenasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>rrnL</i>	Gen mitocondrial que codifica para la subunidad grande del ácido ribonucleico ribosómico
<i>rrnS</i>	Gen mitocondrial que codifica para la subunidad pequeña del ácido ribonucleico ribosómico
<i>trnA</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Alanina
<i>trnC</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Cisteína
<i>trnD</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Ácido Aspártico
<i>trnE</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Ácido Glutámico
<i>trnF</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Fenilalanina
<i>trnG</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Glicina
<i>trnH</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Histidina
<i>trnI</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia

	Isoleucina
<i>trnK</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Lisina
<i>trnL(cun)</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Leucina
<i>trnL(uur)</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Leucina
<i>trnM</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Metionina
<i>trnN</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Asparagina
<i>trnP</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Prolina
<i>trnQ</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Glutamina
<i>trnR</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Arginina
<i>trnS(ucn)</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Serina
<i>trnS(agn)</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Serina
<i>trnT</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Treonina
<i>trnV</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Valina
<i>trnY</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Tirosina
<i>trnW</i>	Gen mitocondrial codificante del ácido ribonucleico de transferencia Triptófano

RESUMEN

El objetivo principal de la presente tesis es esclarecer las relaciones filogenéticas de los Caenogastropoda (grupo central y más diversificado dentro de los Gastropoda) en base a secuencias completas de genomas mitocondriales. Con este análisis filogenético se pretende identificar los principales linajes de Caenogastropoda, testar su monofilia, así como la de los distintos linajes de rango superior propuestos hasta la fecha, dilucidar sus relaciones filogenéticas (tanto externas como internas) y establecer un marco robusto desde el punto de vista estadístico para poder interpretar la evolución del grupo. Previamente se ha considerado necesario seleccionar un grupo externo apropiado para el análisis filogenético tanto de los Gastropoda como de los Caenogastropoda. Con esta finalidad se aporta el genoma mitocondrial de *Scutopus ventrolineatus* (Salvini-Plawen, 1968) para completar así la colección de genomas mitocondriales de moluscos publicados con anterioridad con un linaje nuevo de gran importancia para la sistemática de moluscos, el de los caudofoveados. Dentro de los Caenogastropoda las superfamilias de las que se aporta por primera vez el genoma mitocondrial completo de un representante han sido:

- **Cyclophoroidea**: *Cochlostoma hidalgoi* (Crosse, 1864). Se trata de una de las tres superfamilias que componen los Architaenioglossa, grupo considerado de divergencia temprana en el árbol de los Caenogastropoda.

- **Abyssochrysoidea**: *Ifremeria nautilei* (Bouchet y Warén, 1991). Se trata de la única superfamilia de los Caenogastropoda endémica de las comunidades quimioautótrofas profundas.

- **Naticoidea**: *Naticarius hebraeus* (Martyn, 1786) y **Cypraeoidea**: *Erosaria spurca* (Linnaeus, 1758). Se trata de dos superfamilias importantes de las agrupadas provisionalmente en el taxon informal "Littorinimorpha" y de las que no se conocía ningún mitogenoma.

- **Tonnoidea:** *Galeodea echinophora* (Linnaeus, 1758). Se secuenció el mitogenoma debido a que esta superfamilia parece romper la monofilia de Neogastropoda en estudios moleculares previos (Cunha, 2009).

- **Buccinoidea:** *Columbella adansonii* (Menke, 1853). Esta especie pertenece a la familia Columbellidae, una de las más controvertidas dentro de la gran superfamilia de los buccinoideos, dentro de los Neogastropoda.

Con los nuevos mitogenomas obtenidos, más todos aquellos disponibles de caenogasterópodos en la literatura, se han realizado diversos análisis para establecer relaciones filogenéticas, a nivel de moluscos, gasterópodos y caenogasterópodos. Estos análisis filogenéticos se han completado con otros basados en genes nucleares y combinados.

En el capítulo 3.1 se presenta la secuencia completa (14662 pb) del genoma mitocondrial del Chaetodermomorpha *Scutopus ventrolineatus* (Salvini-Plawen, 1968). Comparada con la de otros moluscos, la posición relativa de los genes codificantes de proteínas de esta especie es muy similar a la conocida en Polyplacophora, Cephalopoda y linajes de divergencia temprana de Bivalvia y Gastropoda (Vetigastropoda y Neritimorpha, pero no Patellogastropoda). Con este nuevo genoma mitocondrial, se puede comparar el ordenamiento génico de las diferentes clases de moluscos y dilucidar el posible ordenamiento consenso de un hipotético molusco ancestral, que resultó ser similar al de varios grupos afines de Spiralia. El árbol filogenético reconstruido en base a datos de secuencia mitocondriales y nucleares recuperó la monofilia de Aplacophora, Aculifera y Conchifera. Dentro de los Conchifera, los Cephalopoda resultaron grupo hermano de Gastropoda y Bivalvia + Scaphopoda.

En el capítulo 3.2 se presenta la secuencia nucleotídica completa del genoma mitocondrial del gasterópodo de las fumarolas submarinas *Ifremeria nautilei*. La molécula de doble cadena tiene una longitud de 15664 pb y codifica para los 37 genes

mitocondriales típicos de los metazoos. El ordenamiento génico de esta especie es prácticamente idéntico al de los genomas de Caenogastropoda y difiere, tan solo, en la posición relativa del gen *trnW*. Las secuencias traducidas a aminoácidos de los genes codificantes fueron alineadas con secuencias ortólogas de gasterópodos representantes de los principales linajes y sus relaciones filogenéticas fueron inferidas. La filogenia resultante apoya la pertenencia de *Ifremeria* a los Caenogastropoda y su relación cercana a las superfamilias de Hypsogastropoda. Por otra parte, se ha elaborado un cronograma que ha sido calibrado con datos del registro fósil, obteniéndose como resultado que el periodo de divergencia de los Abysochrysoidea data del Jurásico Superior - Cretácico Inferior, lo que indica una colonización relativamente moderna de los ambientes quimioautótrofos del océano profundo por parte de estos gasterópodos.

En el capítulo 3.3 se presenta la secuencia de los genomas mitocondriales completos de *Cochlostoma hidalgoi* (Cyclophoroidea), *Naticarius hebraeus* (Naticoidea), *Galeodea echinophora* (Tonnoidea) y *Columbella adansoni* (Buccinoidea), así como el genoma parcial de *Erosaria spurca* (Cypraeoidea). El orden génico de todos ellos resultó acorde con el típico de los Caenogastropoda, excepto el de *C. hidalgoi*, que difiere en la posición relativa de los genes *trnD*, *trnQ*, *trnG*, *trnY* y *trnT*. La reconstrucción filogenética recuperó “Architaenioglossa” (superfamilias Cyclophoroidea, Ampullarioidea y Viviparoidea) como grado basal (parafilético). La monofilia de Sorbeoconcha (todos los Caenogastropoda excepto “Architaenioglossa”) también se recuperó en casi todos los análisis filogenéticos (excluyendo la superfamilia Vermetoidea, que presenta una rama muy larga). La posición relativa de Cerithioidea con respecto a Hypsogastropoda quedó sin resolver, mientras que la monofilia de Hypsogastropoda resultó fuertemente apoyada. Dentro de este clado, los resultados muestran que “Littorinimorpha” debe considerarse como un grado (parafilético) y que varias superfamilias (Abysochrysoidea, Rissooidea,

Truncatelloidea y Naticoidea) fueron divergiendo sucesivamente hasta llegar al clado de especies sifonadas (Stromboidea, Cypraeoidea, Tonnoidea y Neogastropoda), que fue ampliamente apoyado. La posición relativa de la superfamilia Vermetoidea no pudo determinarse debido a problemas de atracción de ramas largas derivados de su mitogenoma altamente modificado. La superfamilia Tonnoidea se recuperó dentro de los Neogastropoda, cuestionando así la monofilia de este grupo tal como se define tradicionalmente, a no ser que se excluya de ella a los Cancellaroidea, superfamilia que se recupera como grupo hermano de Tonnoidea y el resto de Neogastropoda. Por otro lado, los Muricoidea resultaron polifiléticos, y su monofilia solo es posible considerando Volutoidae y Babylonioidae como superfamilias independientes. Asimismo, la superfamilia Buccinoidea, tal y como se considera en la actualidad, debe ser objeto de una revisión profunda.

ABSTRACT

The main objective of this thesis is to further resolve the phylogenetic relationships of Caenogastropoda (the main and most diversified group within Gastropoda) based on complete mitochondrial genome sequences. This phylogenetic analysis aims to identify the main lineages of Caenogastropoda, to test their monophyly, as well as that of the different main lineages of higher taxonomic rank proposed thus far, to elucidate their phylogenetic relationships (both external and internal) and to establish a robust statistical framework to understand the evolution of the group. Previously, it was thought necessary to select an appropriate outgroup for phylogenetic analysis of both Gastropoda and Caenogastropoda. For this purpose, the mitochondrial genome of *Scutopus ventrolineatus* (Salvini-Plawen, 1968) is presented, as the first sequenced within Caudofoveata, in order to further complete the collection of previously published mitochondrial genomes of Mollusca. Within Caenogastropoda, the superfamilies for which a new mitochondrial genome has been sequenced are:

- **Cyclophoroidea:** *Cochlostoma hidalgoi* (Crosse, 1864). It is one of the three superfamilies that are included in Architaenioglossa, a group considered to have early diverged in the Caenogastropoda tree.
- **Abyssochrysoidea:** *Ifremeria nautilei* (Bouchet y Warén, 1991). It is the only superfamily of Caenogastropoda that is endemic to the deep-water chemoautotrophic communities.
- **Naticoidea:** *Naticarius hebraeus* (Martyn, 1786) and **Cypraeoidea:** *Erosaria spurca* (Linnaeus, 1758). Two important superfamilies that belong to "Littorinimorpha", an informal taxon without any representation in the mitochondrial genome catalog.
- **Tonnoidea:** *Galeodea echinophora* (Linnaeus, 1758). This mitogenome was sequenced because this superfamily seems to question the

monophyly of Neogastropoda in previous molecular studies (Cunha *et al.*, 2009).

- **Buccinoidea:** *Columbella adansoni* (Menke, 1853). This species belongs to the family Columbellidae, one of the most controversial ones within the superfamily Buccinoidea, within Neogastropoda.

With the newly determined mitogenomes, plus all those available for Caenogastropoda in the literature, different analyses have been carried out to establish phylogenetic relationships at the mollusc, gastropod, and caenogastropod levels. These phylogenetic analyses have been completed with others based on nuclear genes and combining both, mitochondrial and nuclear genes, in the same data matrix.

In chapter 3.1, the complete mitochondrial genome (14662 bp) of the Chaetodermomorpha *Scutopus ventrolineatus* (Salvini-Plawen, 1968) was sequenced. Compared to other molluscs, the relative position of the mitochondrial protein-coding genes of this species is very similar to those documented for Polyplacophora, Cephalopoda and early divergent lineages of Bivalvia and Gastropoda (Vetigastropoda and Neritimorpha; but not Patellogastropoda). This new mitochondrial genome allows comparing the gene order among the different classes of molluscs, and to deduce the putative consensus gene order of a hypothetical ancestral mollusc, which happened to be very similar to that of closely related Spiralia groups. The monophylies of Aplacophora, Aculifera and Conchifera were recovered based on the combined mitochondrial and nuclear data matrix. Within Conchifera, Cephalopoda was recovered as sister group of Gastropoda and Bivalvia + Scaphopoda.

In chapter 3.2, the complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the deep-sea vent snail *Ifremeria nautilei* was determined. The double stranded circular molecule is 15,664 bp in length and encodes for the typical 37 metazoan mitochondrial genes. The gene arrangement of this species mitochondrial genome is almost identical to that of the mitochondrial genomes of Caenogastropoda and only differs on the

relative position of the *trnW* gene. The deduced amino acid sequences of the protein coding genes were aligned with orthologous sequences from representatives of the main lineages of gastropods and phylogenetic relationships were inferred. The reconstructed phylogeny supports that *Ifremeria* belongs to Caenogastropoda and that it is closely related to hypsogastropod superfamilies. Moreover, a chronogram was calibrated with fossil record data, and the divergence of Abyssochrysoidea was dated in the Late Jurassic–Early Cretaceous indicating a relatively modern colonization of deep-sea chemoautotrophic environments by these gastropods.

In chapter 3.3, the complete mitochondrial genomes of *Cochlostoma hidalgoi* (Cyclophoroidea), *Naticarius hebraeus* (Naticoidea), *Galeodea echinophora* (Tonnoidea), and *Columbella adansoni* (Buccinoidea), and the partial mt genome of *Erosaria spurca* (Cypraeoidea) were sequenced. The gene order of all of them was consistent with the typical of Caenogastropoda, except in the case of *C. hidalgoi*, which differed in the relative positions of the *trnD*, *trnQ*, *trnG*, *trnY*, and *trnT* genes. Phylogenetic reconstruction recovered “Architaenioglossa” (superfamilies Cyclophoroidea, Ampullarioidea, and Viviparoidea) as a basal grade (paraphyletic). The monophyly of Sorbeoconcha (all caenogastropods but “Architaenioglossa”) was supported by most phylogenetic analyses (excluding Vermetoidea, which has a long branch). The relative phylogenetic position of Cerithioidea with respect to Hypsogastropoda remained unresolved, whereas the monophyly of Hypsogastropoda was strongly supported. Within this clade, results showed that “Littorinimorpha” should be considered a grade (Paraphyletic) and that several superfamilies (Abyssochrysoidea, Risssoidea, Truncatelloidea, and Naticoidea) branched off successively before a siphonate clade (Stromboidea, Cypraeoidea, Tonnoidea, Neogastropoda), which was strongly supported. The relative phylogenetic position of the superfamily Vermetoidea could not be determined due to long-branch attraction artifacts derived from their highly modified mitochondrial genome. The superfamily

Tonnoidea was recovered within Neogastropoda, which questions the monophyly of the latter as traditionally defined except excluding Cancellarioidea, a superfamily that was recovered as sister group of Tonnoidea and the remaining Neogastropoda. The Muricoidea were polyphyletic and their monophyly is only possible considering Volutoidae and Babylonioidae as independent superfamilies. Also, Buccinoidea superfamily, as it is currently considered, awaits a thorough revision.



1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LOS GASTROPODA

Los gasterópodos constituyen uno de los grupos más numeroso y diversificado del Reino Animal. Si los moluscos son el segundo filo (después de los artrópodos) en cuanto al número de especies, dentro de ellos los gasterópodos son con diferencia la clase más diversa, con cerca del 80% de todas las especies de moluscos (Bieler, 1992; Haszprunar *et al.*, 2008), y uno de los pocos grupos adaptados a vivir en todos los ambientes, tanto marinos, como de agua dulce o terrestres. Asimismo su plasticidad morfológica y ecológica es enorme, con adaptaciones, por ejemplo, modos de alimentación muy diferentes (microrramoneadores, detritívoros, suspensívoros, herbívoros, carnívoros, carroñeros, endoparásitos, con bacterias quimiosimbiontes). Son también uno de los grupos más numerosos en los ambientes marinos quimioautótrofos profundos, con varios grupos endémicos de este tipo de hábitats. El número estimado de especies actuales de gasterópodos oscila entre 40.000 y 150.000 (Bieler, 1992; Aktipis *et al.*, 2008; Rosenberg, 2014) y, asimismo, cuenta con un extraordinario registro fósil que se remonta hasta el Cámbrico Inferior (Dzik y Mazurek, 2013), por lo que han tenido un lugar destacado en los estudios paleontológicos, que abarcan todo el Fanerozoico. Todo lo anterior hace de los gasterópodos un grupo idóneo para estudios evolutivos y filogenéticos, entre otros muchos aspectos.

La presente introducción se centrará en los aspectos filogenéticos, temática en la que se encuadra la tesis.

1.1.1 SISTEMÁTICA Y FILOGENIA TRADICIONAL

Las clasificaciones prelinneanas de los gasterópodos estaban basadas en la forma de la concha. La primera identificación más o menos correcta de los gasterópodos se debe a Cuvier (1798), pero no fue hasta bien entrado el siglo XIX

cuando los estudios anatómicos impulsaron nuevas clasificaciones basadas en algunos órganos y estructuras internas, como las branquias, el corazón, la posición de la cavidad del manto y, sobre todo en la rádula (Troschel, 1856-1893) o el sistema nervioso (Spengel, 1881; Bouvier, 1887). Sin embargo, la clasificación más influyente de los gasterópodos, y la que se ha mantenido estable durante más tiempo, fue la propuesta por Thiele (1929-1931), que adoptó la división de Milne-Edwards (1848) en tres subclases (Prosobranchia, Opisthobranchia y Pulmonata), basada en el sistema respiratorio. Los prosobranquios eran equiparables a los Streptoneura de Spengel (1881), mientras que las otras dos clases se correspondían con los denominados Euthyneura por este último autor. A su vez, Thiele (1929-1931) subdividió los Prosobranchia en los órdenes Archaeogastropoda, Mesogastropoda y Neogastropoda. Se trataba de un esquema de clasificación lineal y gradualista en el que cada uno de estos grandes grupos se correspondería con progresivos grados evolutivos. La clasificación de Thiele fue mayoritariamente adoptada por casi todos los malacólogos y libros de texto (en algunos todavía se mantiene hoy día erróneamente), incluyendo los grandes tratados y monografías (por ejemplo, los de Wenz, 1938; Cox, 1960; Fretter y Graham, 1965; Hyman, 1967; Boss, 1982, entre otros). Esta clasificación no fue modificada considerablemente hasta la segunda mitad de los años ochenta del pasado siglo, con contadas excepciones, como la clasificación propuesta por Golikov y Starobogatov (1975), que no tuvo aceptación fuera de la “escuela rusa”.

A partir de esas fechas, fueron principalmente cuatro las circunstancias que propiciaron una revolución en la interpretación y la clasificación de los gasterópodos: 1) el descubrimiento de nuevos grupos, sobre todo con motivo de las intensas investigaciones sobre las comunidades asociadas a las emisiones hidrotermales profundas (Sasaki *et al.*, 2010 ofrecen una completa revisión de los gasterópodos asociados a estos medios); 2) los notables avances en los estudios anatómicos propiciados por nuevas técnicas, como los estudios ultraestructurales posibilitados por

el microscopio electrónico de transmisión, que permitieron, por ejemplo, una detallada descripción de los órganos sensoriales (p. ej., Haszprunar, 1985, 1987), o de los espermatozoides (p. ej., Healy, 1988), o más recientemente los programas de reconstrucción en 3D de la anatomía de pequeños organismos a partir de cortes histológicos seriados (ver Brezinger *et al.*, 2014a y b); 3) el establecimiento de la metodología cladista (Hennig, 1950), que permitía el establecimiento de filogenias más objetivas y probables, frente a los esquemas evolutivos y subjetivos que se habían propuesto con anterioridad; y 4) el desarrollo de las técnicas moleculares y su aplicación a los análisis filogenéticos. Cabe mencionar la gran influencia que autores como los británicos Vera Fretter (1905-1992) y Alastair Graham (1906-2000), o los austriacos Luitfried von Salvini Plawen (1939-2014) y su discípulo Gerhard Haszprunar (1957), ejercieron por entonces para inspirar y auspiciar una nueva etapa de la Malacología que aún perdura, pues todavía no se ha alcanzado una clasificación estable y de consenso. Fruto de este nuevo impulso fue el “Symposium on Prosobranch Phylogeny”, desarrollado durante el 9º Congreso Internacional de Malacología (Edimburgo, septiembre de 1986), que dio lugar a la publicación de una monografía así titulada (“Prosobranch Phylogeny”, Ponder, 1988). Dicho simposio tuvo su continuación en el celebrado con motivo del Centenario de la “Malacological Society of London” (Londres, marzo de 1995), origen de la monografía “Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca” (Taylor, 1996) y, años más tarde, en el que tuvo lugar durante el congreso mundial de malacología celebrado en Perth (Australia, julio, 2004) sobre filogenia y evolución de los moluscos, que asimismo dio lugar a la publicación de su correspondiente volumen (Ponder y Lindberg, 2008). Los artículos contenidos en los mencionados volúmenes monográficos constituyen una buena muestra de los avances habidos en lo concerniente a la evolución y filogenia de los gasterópodos. Asimismo, Bieler (1992) y Ponder y Lindberg (1997) ofrecieron una exhaustiva revisión histórica sobre su clasificación.

Al comienzo de esta nueva etapa destacan, entre otras, las publicaciones de Salvini-Plawen (1980), Graham (1985), Haszprunar (1985), o de Salvini-Plawen y Haszprunar (1987), pero sin duda uno de los hitos de mayor influencia en lo que se refiere al estudio de la evolución y filogenia de los gasterópodos lo constituyó el trabajo monográfico de Haszprunar (1988), que sirvió de catalizador para posteriores investigaciones. Dicho trabajo supuso un notable estímulo (aunque su enfoque metodológico fue criticado por Bieler, 1990) y constituyó posiblemente la contribución más importante a la filogenia de los moluscos desde la obra de Thiele (1929-1931). Casi una década después, Ponder y Lindberg (1997) publicaron un nuevo y exhaustivo estudio filogenético de los gasterópodos, esta vez siguiendo estrictamente la metodología cladista y basándose exclusivamente en caracteres morfológicos.

Ya Salvini-Plawen (1980) había propuesto una serie de modificaciones con respecto al esquema tradicional, dividiendo a los gasterópodos en cuatro subclases: las tres tradicionales (Prosobranchia, Opisthobranchia and Pulmonata) más una cuarta, los Gymnomorpha, que incluiría a los Onchidiida (pulmonados marinos) y a los Soleolifera (pulmonados terrestres muy primitivos), grupos ambos que consideraba con características intermedias entre los opistobranquios y los pulmonados. Asimismo, el ilustre zoólogo austriaco dividió el orden Arqueogasterópodos en tres subórdenes: los Vetigastropoda (de nuevo cuño), los Docoglossa (hoy Patellogastropoda) y los Neritopsina. Por otro lado, Graham (1985) señaló a los docoglossos como los gasterópodos más primitivos, como ya había sido propuesto por Golikov y Starobogatov (1975), en contraposición a la idea anterior de que los gasterópodos más antiguos eran los pleurotomarioideos (Fretter y Graham, 1962; Morton y Yonge, 1964). Con posterioridad se aceptó de forma unánime que los Patellogastropoda habían divergido del resto de gasterópodos en una etapa muy temprana (Wingstrand, 1985; Salvini-Plawen y Haszprunar, 1987; Haszprunar, 1988; Lindberg, 1988; entre otros). De hecho, Ponder y Lindberg (1997) separan los gasterópodos en dos grandes

grupos, los Eogastropoda (que comprendían a los Patellogastropoda y sus posibles ancestros de concha espiralada) y los Orthogastropoda, que agrupan al resto de los gasterópodos. Sin embargo, estudios moleculares recientes no consiguen recuperar esta división, pues los Patellogastropoda aparecen situados en diferentes posiciones dentro del árbol filogenético de los gasterópodos (p. ej., Colgan *et al.*, 2000, 2003, Grande *et al.*, 2008; Zapata *et al.*, 2014). Este grupo presenta altas tasas evolutivas tanto en el genoma mitocondrial (asociadas a un profundo reordenamiento génico; Simison *et al.* 2006) como en el nuclear, lo que provoca que este linaje tenga una rama larga en los árboles y sufra el conocido efecto denominado de “atracción de ramas largas” (Felsenstein, 1981), que imposibilita conocer su posición filogenética exacta (Grande *et al.*, 2008; Stöger y Schrödl, 2013).

Por otro lado, en relación al esquema tradicional de Thiele, algunos autores como Fretter y Graham (1962) señalaban la existencia de grupos, como los Pyramidellidae, con características intermedias que no se ajustaban estrictamente ni a los prosobranquios ni a los opistobranquios. Estas peculiares características intermedias se comprobó que eran también compartidas por otros grupos, como los Architectonicidae, Mathildidae o Rissoellidae, que Haszprunar (1985) reunió bajo el nombre de Allogastropoda y para los que Ponder y Warén (1988) propusieron el nombre más antiguo de Heterostropha. A este grupo informal de relaciones inciertas se fueron añadiendo sucesivamente nuevas familias (Amathinidae, Omalogyridae, Glacidorbidae, Valvatidae, Tjaernoellidae, Xilodisculidae, Hyalogirinidae, Cimidae, Aclididae, Orbitestellidae, Tofanellidae, Murchisonellidae) (Ponder, 1991; Warén, 1993; Warén *et al.*, 1993; Haszprunar *et al.*, 2011; Brezinger *et al.*, 2013b) o grupos enigmáticos como los Rhodopemorpha (Brezinger *et al.*, 2014a). Otros pequeños y raros gasterópodos, que están siendo estudiados en la actualidad, podrían también ser incluidos dentro de este conjunto cuyas intrincadas relaciones filogenéticas están

aún por aclarar (véanse p. ej., Dinapoli y Klussmann-Kolb, 2010; Jörger *et al.*, 2010; Haszprunar *et al.*, 2011, 2013).

Durante las dos últimas décadas se ha publicado un buen número de trabajos para esclarecer las relaciones de los denominados “gasterópodos avanzados” (“higher gastropods”) o más formalmente, Heterobranchia (nombre acuñado por Haszprunar, 1985), clado considerado hoy día como monofilético. Los Heterobranchia incluyen a los opistobranquios y pulmonados (los Euthyneura) y al conjunto parafilético de grupos antes mencionados (“Allogastropoda” o “Heterostropha”). Como consecuencia de estas investigaciones se ha ido produciendo un “baile de taxones”, de tal forma que, en la actualidad, se consideran también a los opistobranquios y pulmonados como conjuntos parafiléticos. Así, por ejemplo, los estudios moleculares han demostrado que los Sacoglossa (antes un orden dentro de los opistobranquios) están más relacionados con los Siphonarioidea (tradicionalmente considerados dentro de los pulmonados) que con los opistobranquios (Grande *et al.*, 2004a, b, corroborado por trabajos posteriores) o que los Pyramidellidae (antes alogasterópodos) y los ACOCHLIDIA (antes un orden dentro de los opistobranquios) están más relacionados con grupos de pulmonados y son incluidos ahora todos ellos en un gran clado denominado Panpulmonata (Jörger *et al.*, 2010; Kokot *et al.*, 2013; Wägele *et al.*, 2014, entre otros).

En cualquier caso, a pesar de los importantes avances habidos en lo referente a la evolución y filogenia de los gasterópodos, las diferentes aproximaciones generales basadas en datos morfológicos, incluyendo los ultraestructurales (p. ej., Golikov y Starobogatov, 1975; Graham, 1985; Haszprunar, 1985, 1988; Healy, 1988, 1996; Bieler, 1992; Ponder y Lindberg, 1997; Aktipis *et al.*, 2008), del desarrollo embrionario (p. ej., Freeman y Londelius, 1992, van der Bigelaar, 1996; van der Bigelaar y Haszprunar, 1996, 1996; Lindberg y Guralnick, 2003), del registro fósil (p. ej., Wagner, 1995, 2001; Bandel, 1997; Fryda, 1999), o moleculares (p. ej., Colgan *et al.*, 2000,

2003; McArthur y Harasewych, 2003; Zapata *et al.*, 2014), han dado lugar a muy distintas interpretaciones sobre las relaciones filogenéticas de los gasterópodos, y aún hoy día permanecen sin resolver en buena parte. Muchos de estos estudios coinciden en identificar algunos de los principales linajes y apoyar su monofilia, pero muestran discrepancias y no resuelven sus relaciones filogenéticas. Los cinco grandes clados que hoy día hay coincidencia en aceptar dentro de los gasterópodos son: Patellogastropoda, Vetigastropoda, Neritimorpha, Caenogastropoda y Heterobranchia, mientras que queda pendiente de resolver la identidad de los Cocculiniformia y Neomphalina, así como las relaciones entre todos ellos.

En paralelo a los avances habidos en este campo, se han ido proponiendo diferentes clasificaciones generales de los gasterópodos, como las de Cox (1960), Taylor y Solh (1962), Vaught (1989), Beesley *et al.* (1998), siendo la de Bouchet y Rocroi (2005) la última propuesta que sirve de referencia general en la actualidad y es la aceptada en esta tesis (ver también la clasificación existente en WoRMS modificada a partir de la de estos autores).

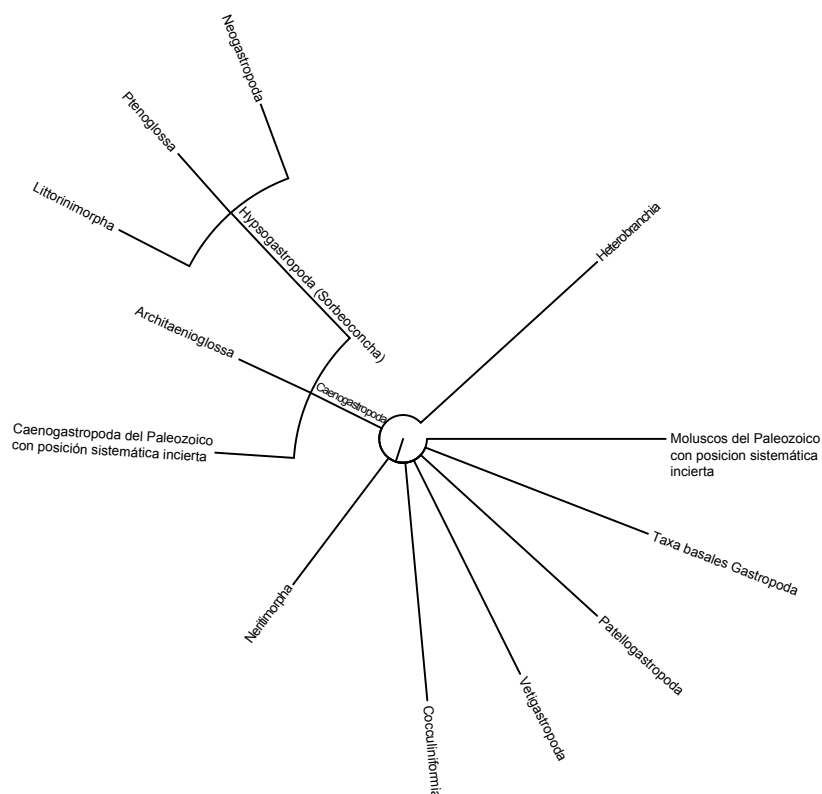


FIG. 1.1 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PRINCIPALES GRUPOS SEGÚN BOUCHET Y ROCROI (2005). PARA VER UN RESUMEN MÁS COMPLETO VER APÉNDICE

1.1.2 LAS FILOGENIAS MOLECULARES

Como ya se ha comentado anteriormente, la utilización de las herramientas moleculares se ha convertido en rutinaria en los estudios filogenéticos. En el caso de los gasterópodos se cuenta ya con una larga serie de artículos que abordan la filogenia del grupo a partir de secuencias de ADN. El primer estudio molecular sobre la sistemática de los gasterópodos fue el de Emberton *et al.* (1990), usando un fragmento del gen nuclear ribosómico 28S. Autores posteriores, basándose en secuencias del mismo gen, ampliaron el número de taxones tratados en sucesivos estudios (Rosenberg *et al.*, 1994, 1997; Tillier *et al.*, 1992, 1994). Sin embargo, en algunos de estos artículos ya se puso de manifiesto que la utilización de un fragmento corto del gen 28S tenía una utilidad limitada para abordar una filogenia completa de

los gasterópodos, sobre todo para dilucidar eventos de diversificación que tuvieron lugar en épocas tempranas (Cámbrico, Paleozoico o incluso en el Mesozoico) (McArthur y Koop, 1999). Por su lado, Winnepenninckx *et al.* (1998) utilizaron secuencias completas del gen ribosómico 18S para estudiar la filogenia de los gasterópodos, aunque con una exigua representación de los grupos de divergencia temprana, que fue ampliada en trabajos posteriores, utilizando este mismo gen ribosómico (McArthur y Koop 1999; McArthur y Harasewych, 2003). Asimismo, Harasewych *et al.* (1997a) se basaron en secuencias parciales del gen 18S y del gen mitocondrial citocromo c oxidasa (*cox1*) de representantes de los principales clados de gasterópodos para investigar las afinidades de la familia Pleurotomariidae, tradicionalmente considerada como un grupo hermano del resto de gasterópodos. Sin embargo, estos genes ribosómicos seguían mostrando una escasa resolución para resolver las relaciones basales de los gasterópodos. Colgan *et al.* (2000) abordaron el estudio de la filogenia de los gasterópodos utilizando dos segmentos del gen 28S y del gen nuclear histona H3, e incluyendo una amplia representación del grupo. Posteriormente, Colgan *et al.* (2003) añadieron al análisis secuencias de tres genes adicionales, un nuevo segmento del gen 28S, el pequeño gen nuclear ADN U2 y un segmento del gen mitocondrial *cox1*. Pero los resultados obtenidos por estos últimos autores no recuperan algunos de los principales taxones resultantes de las filogenias morfológicas. Años más tarde, Aktipis *et al.* (2008) analizaron de nuevo la filogenia de los gasterópodos con un análisis combinado de los caracteres morfológicos y de secuencias del gen 18S completo, un fragmento del 28S, el gen nuclear histona H3, y fragmentos de los genes mitocondriales *cox1* y *rnl*. Finalmente, Zapata *et al.* (2014) han reevaluado recientemente las relaciones filogenéticas de los gasterópodos mediante transcriptómica.

Los resultados obtenidos en todos estos trabajos no se van a mencionar aquí, pues serán tratados en la discusión final de la presente tesis, así como en los

correspondientes apartados de los tres capítulos de resultados. Sí se puede comentar en grandes líneas que, mientras la mayor parte de estos estudios apoyan la monofilia de los cinco grandes clados que hoy día se aceptan dentro de los gasterópodos (Patellogastropoda, Vetigastropoda, Neritimorpha, Caenogastropoda y Heterobranchia), las relaciones entre ellos y con los Cocculiniformia y Neomphalina siguen siendo objeto de debate, así como las relaciones internas dentro de estos grandes clados. Por otro lado, las filogenias moleculares no recuperan la división Eogastropoda/Orthogastropoda, ampliamente aceptada anteriormente en las filogenias morfológicas, por los problemas antes mencionados.

En paralelo a las filogenias generales sobre los gasterópodos, se han ido publicando un buen número de filogenias moleculares centradas en grupos concretos de esta gran clase de moluscos, que sería prolijo detallar aquí. Muchas de estas publicaciones aportan información relevante sobre las relaciones internas de los grupos tratados, que se comentarán asimismo en la discusión general o en las correspondientes a cada capítulo. En definitiva, sigue siendo necesario dilucidar las relaciones filogenéticas de los principales linajes de gasterópodos a fin de comprender y tener una idea más precisa de su evolución. Por ello, la tendencia actual es el uso de nuevas metodologías (análisis probabilísticos), así como de secuencias largas de ADN (frente a fragmentos cortos), para poder lograr resolver con robustez estadística la filogenia de este gran grupo del Reino Animal. En este sentido, el análisis de los genomas mitocondriales completos es de gran utilidad como complemento a las investigaciones mencionadas anteriormente, ya que aporta evidencias relevantes sobre la evolución del grupo. La principal limitación que presenta la mitogenómica radica en que todavía sigue siendo muy reducido el número de genomas mitocondriales completos conocidos (alrededor del centenar). Este aspecto se comenta en el apartado siguiente.

1.2 MITOGENÓMICA

El genoma mitocondrial de los metazoos tiene un tamaño y una estructura bastante uniformes. Su tamaño está comprendido entre 14 y 20 kb y está generalmente constituido por 37 genes: 13 codificantes de proteínas (PC), 2 genes de ARNs ribosómicos y 22 de ARNs de transferencia (Wolstenholme, 1992). Como todos estos genes mitocondriales residen en una misma molécula circular de ADN de doble cadena, se ha considerado a menudo, implícita o explícitamente, al mitogenoma como un único "supergén", y la posibilidad de combinar las secuencias de cada gen individual en análisis filogenéticos. De hecho, la secuencia completa del genoma mitocondrial ha mostrado su gran utilidad para dilucidar las relaciones filogenéticas en diversas ramas del Reino Animal (p. ej., Miya *et al.*, 2003; Yokobori *et al.*, 2004, Medina *et al.*, 2006; Muller, 2006; Cameron *et al.*, 2007; Lavrov, 2007, Bernt *et al.* 2013; Havird y Santos, 2014, entre otros). Mientras el ADN mitocondrial se mantiene muy estable en vertebrados, se han detectado diferentes cambios en el orden génico en el mitogenoma de diversos filos de invertebrados, y se ha demostrado que son particularmente frecuentes en algunos de ellos, como nematodos o moluscos (Boore *et al.*, 2005). Debido al enorme número de reordenamientos posibles en el genoma mitocondrial, unido a la baja tasa con la que ocurren, se asume que los fenómenos de convergencia de estos reordenamientos son poco probables. Por lo tanto, la presencia compartida de reordenamientos similares en diferentes taxones puede interpretarse como que esos taxones derivan de un ancestro común (Grande *et al.*, 2008).

Como se ha dicho, los moluscos constituyen el segundo filo animal más diversificado, después de los Artrópodos, y los gasterópodos la clase de moluscos que mayor número de taxones comprende. Sin embargo, el estudio de las secuencias completas del mitogenoma en moluscos no ha progresado al mismo ritmo que en otros grupos, sobre todo en comparación con los vertebrados y los artrópodos. Las 97 especies de las que se conoce la secuencia del genoma mitocondrial completo a día

de hoy (30 de abril de 2015) (ver Tabla 1.1) suponen todavía una representación muy exigua de los gasterópodos, si tenemos en cuenta el enorme número de especies y grupos que comprenden. A pesar de ello, el campo de la mitogenómica en los gasterópodos es particularmente prometedor, ya que en ellos el genoma presenta una mayor variedad de ordenaciones génicas en comparación con otros grupos de metazoos (Simison y Boore, 2008; Grande *et al.*, 2008, Medina *et al.*, 2011). Por este motivo, nuestro grupo de investigación tiene entre uno de sus principales objetivos ampliar esta representación, secuenciando el mitogenoma de especies pertenecientes a grupos no investigados hasta la fecha; la presente tesis se encuadra dentro de esta finalidad. De las 97 especies de gasterópodos con el mitogenoma secuenciado hasta la fecha, 14 han sido secuenciadas por el equipo del Museo de Ciencias Naturales de Madrid (14%), a las que en la presente tesis se añaden cinco más (*Cochlostoma hidalgoi* (Crosse 1864), *Ifremeria nautilei* (Bouchet y Warén 1991), *Naticarius hebraeus* (Martyn 1786), *Galeodea echinophora* (Linnaeus 1758) y *Columbella adansoni* (Menke 1853)) y otra de la que se presenta el mitogenoma casi completo (*Erosaria spurca* (Linnaeus 1758)).

El primer gasterópodo cuyo mitogenoma completo fue secuenciado fue el pulmonado *Albinaria caerulea* (Hatzoglou *et al.*, 1995), el primer opistobranquio fue *Pupa strigosa* (Kurabayashi y Ueshima, 2000), el primer nudibranquio fue *Roboastra europaea* (Grande *et al.*, 2002), el primer Vetigastropoda fue *Haliotis rubra* (Maynard *et al.*, 2005), el primer patelogasterópodo fue *Lottia digitalis* (Simison *et al.*, 2006), el primer caenogasterópodo fue *Otitoma lirata* (como *Lophiotoma cerithiformis* por Bandyopadhyay *et al.*, 2006), el primer nerítáceo fue *Nerita melanotragus* (Castro y Colgan, 2010) y el primer Neomphalina fue *Crysmallon squamiferum* (Nakagawa *et al.*, 2014). Hasta la fecha, no se conoce el mitogenoma completo de ningún representante de los Cocculiniformia.

La primera revisión general sobre la evolución del genoma mitocondrial de los gasterópodos fue realizada por Grande *et al.* (2008), quienes presentaron una reconstrucción filogenética con los mitogenomas de las 16 especies de gasterópodos conocidos hasta la fecha. Posteriormente, se fueron publicando sucesivos trabajos que, aunque se centraban en grupos concretos de gasterópodos, presentaban también las filogenias resultantes de analizar los mitogenomas completos del conjunto de gasterópodos, como los de Cunha *et al.* (2009) sobre Neogastropoda, Rawlings *et al.* (2010) sobre Vermetidae, Medina *et al.* (2011) sobre “opisthobranchios”, White *et al.* (2011) sobre “pulmonados”, o Arquez *et al.* (2014) sobre Neritimorpha. Cabe destacar también que el ritmo de descripción de mitogenomas de gasterópodos se ha incrementado notablemente en los últimos años, sobre todo por parte de investigadores chinos (véanse los datos de la Tabla 1.1), aunque normalmente estos investigadores no presentan análisis filogenéticos asociados. Asimismo hay que señalar que la utilización de las secuencias completas del mitogenoma para las reconstrucciones filogenéticas en moluscos no ha estado exenta de ciertas críticas (e.g. Stöger y Schrödl, 2013), sobre todo por el efecto de distorsión denominado “atracción de las ramas largas” (“long branch attraction”) que producen los reordenamientos drásticos que han sufrido algunos grupos, como los Patellogastropoda, los Vermetidae o los Heterobranchia. Estos reordenamientos, sobre todo si involucran cambios de la cadena codificadora, producen también sesgos en la composición nucleotídica que afectan a la inferencia filogenética. Finalmente, las mutaciones sucesivas en una misma posición, debidas a la alta tasa evolutiva del genoma mitocondrial, producen fenómenos de saturación que dan lugar a divergencias similares, o equivalentes, a las observadas entre los linajes principales de gasterópodos, borrando así la señal filogenética.

Los resultados de estos estudios se comentarán al discutir los resultados obtenidos en la presente tesis. Como resumen, puede señalarse que buena parte de

los gasterópodos (Vetigastropoda y Caenogastropoda) presenta, salvo excepciones, un genoma mitocondrial muy poco modificado con respecto al ancestral (similar al de los polioplacóforos), mientras que los mayores reordenamientos génicos se dan en los Patellogastropoda, por un lado, y en los Heterobranchia, por otro (Simison y Boore, 2008; Grande *et al.*, 2008).

TABLA 1.1 MITOGENOMAS DE GASTERÓPODOS PUBLICADOS HASTA EL MOMENTO (30/04/2015). * LOS NUEVOS MITOGENOMAS APORTADOS EN ESTE TRABAJO

Especie	Posición taxonómica	Referencia
PATELLOGASTROPODA		
<i>Lottia digitalis</i>	Lottiidae; Lottioidea	Simison <i>et al.</i> , 2006
NEOMPHALINA		
<i>Crhysomallon squamiferum</i>	Peltospiridae, Neomphalioidea	Nakagawa <i>et al.</i> , 2014
NERITIMORPHA		
<i>Nerita melanotragus</i>	Neritidae	Castro y Colgan, 2010
<i>Nerita versicolor</i>	Neritidae	Arquez <i>et al.</i> , 2014
<i>Nerita tessellata</i>	Neritidae	Arquez <i>et al.</i> , 2014
<i>Nerita fulgurans</i>	Neritidae	Arquez <i>et al.</i> , 2014
VETIGASTROPODA		
<i>Haliotis rubra</i>	Haliotidae, Haliotoidea	Maynard <i>et al.</i> , 2005
<i>Haliotis tuberculata</i>	Haliotidae, Haliotoidea	Van Wormhoudt <i>et al.</i> , 2011
<i>Haliotis diversicolor</i>	Haliotidae, Haliotoidea	Xin <i>et al.</i> , 2011
<i>Lunella aff.cinerea</i>	Turbinidae, Trochoidea	Williams <i>et al.</i> , 2013
<i>Tegula brunnea</i>	Tegulidae, Trochoidea	Simison, 2014
<i>Fissurella volcano</i>	Fissurellidae, Fisurelloidea	Simison, 2013
CAENOCASTROPODA		
<i>Pomacea canaliculata</i>	Ampullarioidea, Architaenioglossa	Zhou <i>et al.</i> , 2014
<i>Marisa cornuarietis</i>	Ampullarioidea, Architaenioglossa	Wang & Qiu, 2014
<i>Cipangopaludina cathayensis</i>	Viviparoidae, Architaenioglossa	Yang <i>et al.</i> , 2014
<i>Cochlostoma hidalgoi</i>*	Cyclophoroidea, Architaenioglossa	Osca <i>et al.</i>, 2015
<i>Dendropoma maximum</i>	Vermetoidea	Rawlings <i>et al.</i> , 2010
<i>Dendropoma gregarium</i>	Vermetoidea	Rawlings <i>et al.</i> , 2010
<i>Thylaeodus squamigerus</i>	Vermetoidea	Rawlings <i>et al.</i> , 2010
<i>Eualetes tulipa</i>	Vermetoidea	Rawlings <i>et al.</i> , 2010

<i>Semisulcospira libertine</i>	Cerithioidea	Zeng <i>et al.</i> , 2014
<i>Naticarius hebraeus</i>*	Naticoidea, "Littorinimorpha"	Osca <i>et al.</i>, 2015
<i>Oncomelania hupensis</i>	Truncatelloidea, "Littorinimorpha"	Zhao <i>et al.</i> , 2005
<i>Potamopyrgus antipodorum</i>	Truncatelloidea, "Littorinimorpha"	Neiman <i>et al.</i> , 2010
<i>Potamopyrgus estuarinus</i>	Truncatelloidea, "Littorinimorpha"	Neiman <i>et al.</i> , 2010
<i>Tricula hortensis</i>	Rissooidea, "Littorinimorpha"	Zhao <i>et al.</i> , 2005
<i>Ifremeria nautilei</i>*	Abyssochrysoidea, "Littorinimorpha"	Osca <i>et al.</i>, 2014
<i>Erosaria spurca</i>*	Cypraeoidea, "Littorinimorpha"	Osca <i>et al.</i>, 2015
<i>Lobatus gigas</i> = <i>Strombus gigas</i>	Stromboidea, "Littorinimorpha"	Márquez <i>et al.</i> , 2014
<i>Monoplex parthenopeus</i> = <i>Cymatium parthenopeum</i>	Tonnoidea, "Littorinimorpha"	Cunha <i>et al.</i> , 2009
<i>Galeodea echinophora</i>*	Tonnoidea, "Littorinimorpha"	Osca <i>et al.</i>, 2015
<i>Cancellaria cancellata</i>	Cancellarioidea, Neogastropoda	Cunha <i>et al.</i> , 2009
<i>Amalda northlandica</i>	Olivioidea, Neogastropoda	McComish <i>et al.</i> , 2010
<i>Thais clavigera</i>	Muricoidea, Neogastropoda	Ki <i>et al.</i> , 2010
<i>Concholepas concholepas</i>	Muricoidea, Neogastropoda	Núñez Acuña <i>et al.</i> , 2013
<i>Bolinus brandaris</i>	Muricoidea, Neogastropoda	Cunha <i>et al.</i> , 2009
<i>Rapana venosa</i>	Muricoidea, Neogastropoda	Chandler <i>et al.</i> , 2008; Sun & Yang, 2014
<i>Reishia clavigera</i>	Muricoidea, Neogastropoda	Jun <i>et al.</i> , 2012 ?
<i>Babylonia areolata</i>	Muricoidea, Neogastropoda	Jun <i>et al.</i> , 2012 ?
<i>Babylonia lutosa</i>	Muricoidea, Neogastropoda	Xiong <i>et al.</i> , 2015
<i>Ilyanassa obsoleta</i>	Buccinoidea, Neogastropoda	Simison <i>et al.</i> , 2006
<i>Nassarius reticulatus</i>	Buccinoidea, Neogastropoda	Cunha <i>et al.</i> , 2009
<i>Columbella adansoni</i>*	Buccinoidea, Neogastropoda	Osca <i>et al.</i>, 2015
<i>Cymbium olla</i>	Muricoidea, Neogastropoda	Cunha <i>et al.</i> , 2009
<i>Oxymeris dimidiata</i>	Conoidea, Neogastropoda	Cunha <i>et al.</i> , 2009
<i>Otitoma lirata</i>	Conoidea, Neogastropoda	Bandyopadhyay <i>et al.</i> , 2006
<i>Fusiturris similis</i>	Conoidea, Neogastropoda	Cunha <i>et al.</i> , 2009
<i>Conus textile</i>	Conoidea, Neogastropoda	Bandyopadhyay <i>et al.</i> , 2008
<i>Conus borgesii</i>	Conoidea, Neogastropoda	Cunha <i>et al.</i> , 2009
<i>Conus consors</i>	Conoidea, Neogastropoda	Brauer <i>et al.</i> , 2012
HETEROBRANCHIA BASAL		
"HETEROSTROPHA"		
<i>Pyramidella dolabrata</i>	Pyramidellidae	Grande <i>et al.</i> , 2008
OPISTHOBANCHIA		
<i>Pupa strigosa</i>	Architectibranchia	Kurabayashi & Ueshima, 2000a
<i>Micromelo undata</i>	Architectibranchia	Medina <i>et al.</i> , 2011

<i>Hydatina physis</i>	Architectibranchia	Medina <i>et al.</i> , 2011
<i>Sagaminopteron nigropunctatus</i>	Cephalaspidea	Medina <i>et al.</i> , 2011
<i>Odontoglaia guamensis</i>	Cephalaspidea	Medina <i>et al.</i> , 2011
<i>Smaragdinella calycula</i>	Cephalaspidea	Medina <i>et al.</i> , 2011
<i>Bulla</i> sp.	Cephalaspidea	Medina <i>et al.</i> , 2011
<i>Tylodina perversa</i>	Umbracoloidea	Grande <i>et al.</i> , 2008
<i>Aplysia californica</i>	Anaspidea	Knudsen <i>et al.</i> , 2006
<i>Aplysia kurodai</i>	Anaspidea	An <i>et al.</i> , 2014
<i>Aplysia vacaria</i>	Anaspidea	Medina <i>et al.</i> , 2011
<i>Aplysia dactylomela</i>	Anaspidea	Medina <i>et al.</i> , 2011
<i>Ascobulla fragilis</i>	Sacoglossa	Grande <i>et al.</i> , 2008
<i>Thuridila gracilis</i>	Sacoglossa	Medina <i>et al.</i> , 2011
<i>Elysia chlorotica</i>	Sacoglossa	Rumpho <i>et al.</i> , 2008
<i>Placida</i> sp.	Sacoglossa	Fan <i>et al.</i> , 2013
<i>Berthellina ilisima</i>	Pleurobranchioidea	Medina <i>et al.</i> , 2011
<i>Roboastra europaea</i>	Nudibranchia	Grande <i>et al.</i> , 2002
<i>Aegires gardineri</i>	Nudibranchia	Medina <i>et al.</i> , 2011
<i>Chromodoris magnifica</i>	Nudibranchia	Medina <i>et al.</i> , 2011

PULMONATA

<i>Siphonaria pectinata</i>	Siphonarioidea, Basommatophora	Grande <i>et al.</i> , 2008
<i>Siphonaria gigas</i>	Siphonarioidea, Basommatophora	White <i>et al.</i> , 2011
<i>Salinator rhamniphidia</i>	Amphiboloidea, Basommatophora	White <i>et al.</i> , 2011
<i>Galva pelvia</i>	Limnaeoidae, Basommatophora	Liu <i>et al.</i> , 2012
<i>Radix balthica</i>	Limnaeoidae, Basommatophora	Feldmeyer <i>et al.</i> , 2010
<i>Biomphalaria glabrata</i>	Planorboidea, Basommatophora	DeLong <i>et al.</i> , 2004
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Planorboidea, Basommatophora	Jannotti-Passos <i>et al.</i> , 2010
<i>Physella acuta</i>	Planorboidea, Basommatophora	Nolan <i>et al.</i> , 2014
<i>Auriculinea bidentata</i>	Ellobioidea, Eupulmonata	White <i>et al.</i> , 2011
<i>Ovatella vulcani</i>	Ellobioidea, Eupulmonata	White <i>et al.</i> , 2011
<i>Pedipes pedipes</i>	Ellobioidea, Eupulmonata	White <i>et al.</i> , 2011
<i>Myosotella myosotis</i>	Ellobioidea, Eupulmonata	Grande <i>et al.</i> , 2008
<i>Trimusculus reticulatus</i>	Trimusculoidea, Eupulmonata	White <i>et al.</i> , 2011
<i>Onchidiella celtica</i>	Onchidioidea, Systellommatophora	Grande <i>et al.</i> , 2008
<i>Onchidiella borealis</i>	Onchidioidea, Systellommatophora	Medina <i>et al.</i> , 2011
<i>Onchidium struma</i>	Onchidioidea, Systellommatophora	Wei <i>et al.</i> , 2011
<i>Paraoncidium reevesii</i>	Onchidioidea, Systellommatophora	Zhu <i>et al.</i> , 2012
<i>Platevindex mortoni</i>	Onchidioidea, Systellommatophora	Wei <i>et al.</i> , 2010
<i>Platevindex</i> sp.	Onchidioidea, Systellommatophora	Liu <i>et al.</i> , 2014b
<i>Peronia peronii</i>	Onchidioidea, Systellommatophora	White <i>et al.</i> , 2011
<i>Peronia verruculata</i>	Onchidioidea, Systellommatophora	Liu <i>et al.</i> , 2014a
<i>Rhopalocaulis grandidieri</i>	Veronicellidae, Systellommatophora	White <i>et al.</i> , 2011
<i>Succinea putris</i>	Succineidae, Stylommatophora	White <i>et al.</i> , 2011
<i>Albinaria coerulea</i>	Clausillidae, Stylommatophora	Hatzoglou <i>et al.</i> , 1995
<i>Euhadra herklotsi</i>	Helicidae, Stylommatophora	Yamazaki <i>et al.</i> , 1997

<i>Cepaea nemoralis</i>	Helicidae, Stylommatophora	Terrett <i>et al.</i> , 1996
<i>Cylindrus obtusus</i>	Helicidae, Stylommatophora	Groenenberg <i>et al.</i> , 2012
<i>Cornu aspersum</i>	Helicidae, Stylommatophora	Gaitán-Espitia <i>et al.</i> , 2013
<i>Achatina fulica</i>	Achatinidae, Stylommatophora	He <i>et al.</i> , 2014
<i>Mastigeulota kiangsinensis</i>	Bradibaenidae, Stylommatophora	Deng <i>et al.</i> , 2014
<i>Camaena cicatricosa</i>	Camaenidae, Stylommatophora	Wang <i>et al.</i> , 2014

1.3 REGISTRO FÓSIL, ORIGEN DE LOS DISTINTOS LINAJES Y RELOJES MOLECULARES

Los taxones actuales son solo la parte visible (una foto fija) que queda de lo que ha sido una larga historia evolutiva y son representantes de una radiación que ha dejado a muchos de sus miembros extintos por el camino. A partir de los datos neontológicos es posible reconstruir la historia evolutiva por medio de análisis filogenéticos, tanto morfológicos (que permiten dilucidar la evolución de los caracteres) como basados en secuencias de ADN. No obstante, el conocimiento del registro fósil es un complemento importante para reconstruir el pasado y para aportar algunas de las piezas que faltan en el escenario. Desde luego, los fósiles son los únicos testigos reales de fenologías del pasado y desempeñan un papel crucial para desentrañar la historia evolutiva.

Precisamente, el extenso registro fósil de los gasterópodos, así como la abundante bibliografía sobre el mismo, junto a la enorme diversidad que presentan en la actualidad, hacen de éste un grupo idóneo para estudios macroevolutivos. Por otro lado, tener dataciones lo más precisas posibles en el registro fósil del periodo de aparición de diferentes linajes es imprescindible para calibrar los denominados “relojes moleculares”, que permiten estimar el tiempo transcurrido desde la divergencia de dos linajes actuales a partir de su ancestro común, comparando secuencias de ADN (ver Arbogast *et al.*, 2002; Drummond *et al.*, 2006; Yang y Rannala, 2006, entre otros). La paleontología, de forma recíproca, se beneficia de las reconstrucciones filogenéticas basadas en los caracteres (morfológicos y moleculares) que proporcionan los taxones actuales.

Los gasterópodos se extienden en el registro fósil desde el Cámbrico (Tracey *et al.*, 1993); sin embargo existe una gran controversia en determinar la identidad de sus primeros representantes. Se asume que los precursores de los gasterópodos surgieron en el Cámbrico inferior entre un grupo parafilético de ocho familias de

moluscos univalvos agrupados bajo el nombre de Archaeobranchia, para algunas de los cuales se han propuesto clases independientes, como Paragastropoda o Helcionelloida (ver discusión en Parkhaev, 2008). Dichos moluscos experimentaron su máxima radiación hacia el Cámbrico medio, pero la escasez de fósiles en la transición del Cámbrico al Ordovícico oscurece la relación de estos grupos con los ancestros de los linajes actuales de gasterópodos, los cuales han sido considerados por Wagner (1999) como grupos externos.

La clasificación de los gasterópodos primitivos, así como sus relaciones filogenéticas, que se postulan en el famoso “*Treatise on Invertebrate Paleontology*” (Knight *et al.*, 1960), se basan exclusivamente en caracteres de la teloconcha en comparación con los taxones actuales, y ha sido muy cuestionada y modificada con posterioridad (ver p. ej., Tracey *et al.*, 1993). En la actualidad, se considera que los caracteres de la teloconcha no son informativos para establecer relaciones a niveles taxonómicos altos y cada vez se concede más importancia a la protoconcha, pues sus caracteres son más estables y, además, reflejan aspectos del tipo de desarrollo larvario (ver Nützel *et al.*, 2008). Basándose en el estudio de las protoconchas, Nützel y Fryda (2003) y Nützel *et al.* (2006) concluyeron que no se conocen moluscos con protoconchas planctotróficas en el Cámbrico, pero ya eran abundantes en el Ordovícico. Por tanto, dichos autores asumen que el desarrollo planctotrófico se adquirió en los gasterópodos en la transición del Cámbrico al Ordovícico.

Recientemente, Zapata *et al.* (2014) dataron mediante un reloj molecular los principales eventos de diversificación de los gasterópodos, apoyado por datos del registro fósil (Tracey *et al.*, 1993; Nützel *et al.*, 2008). Dichos autores postulan un origen cámbrico del ancestro común de los gasterópodos y que la diversificación que dio lugar a los principales linajes que condujeron a los representantes actuales se produjo entre el Ordovícico y el Devónico. Siempre según Zapata *et al.* (2014), los Vetigastropoda fueron los primeros en divergir (en el Devónico/Carbonífero) y sufrieron

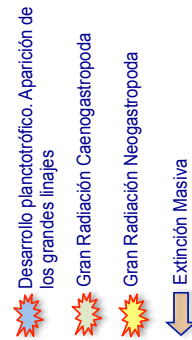
una progresiva diversificación en épocas posteriores. Poco después divergieron los Neritimorpha, seguidos de los Heterobranchia y Caenogastropoda. Sin embargo, mientras los Neritimorpha y Heterobranchia sufrieron una radiación temprana en el Carbonífero, los Caenogastropoda no sufrieron su diversificación hasta una época más tardía, en la transición del Pérmico al Triásico, y su gran radiación se produjo después de la masiva extinción de finales del Pérmico (hace unos 254 millones de años), que causó la desaparición de buena parte de los taxones marinos y que cambió radicalmente la composición taxonómica de los ecosistemas marinos. Ello pudo ser el origen también de la gran diversificación que, asimismo, sufrieron otros grupos de gasterópodos, como los Heterobranchia y dentro de ellos, en especial, los Nudipleura.

En lo referente al registro fósil (Fig. 1.2), el primer fósil conocido atribuido a los Patellogastropoda es *Floripatella*, datado en el Ordovícico, hace unos 464 Ma (Lindberg, 2008). Los Vetigastropoda, según Fryda *et al.* (2008) aparecieron en la transición del Cámbrico al Ordovícico, junto a otros de los grandes linajes de gasterópodos, y se diversificaron durante la radiación temprana del Ordovícico, aproximadamente hace unos 490 Ma.

Dentro de los Neritopsina, los Neritopsidae se consideran los miembros más primitivos, los cuales aparecen en el registro fósil en el Devónico Inferior (hace 400 Ma) (Bandel, 1997). Este mismo autor también señala que los verdaderos Caenogastropoda se reconocen desde el Carbonífero inferior (hace unos 350 Ma), aunque algunos taxones de aparición anterior (Loxonematidae) han sido señalados como precursores de este gran clado de gasterópodos actuales (Kaim, 2004). Asimismo, Nützel *et al.* (2008), basándose en las protoconchas de los grupos fósiles, señalan que los Caenogastropoda divergieron de los Neritopsina y Heterobranchia en el Devónico. De hecho, el fósil más antiguo conocido de Heterobranchia procede del Devónico Medio (hace unos 390 Ma) (Bandel y Heidelberger, 2002). Por otro lado, Jorger *et al.* (2010), por medio de un reloj molecular, señalan que los Euthyneura

divergieron de los “Heterobranchia basales” hacia el final del Carbonífero (hace unos 300 Ma) y su diversificación, que dio lugar a los taxones actuales, se produjo durante el Pérmico.

De acuerdo con el registro fósil, los opistobranquios más antiguos se conocen desde el Triásico (hace unos 220 Ma), mientras que los primeros pulmonados aparecen en el Jurásico (hace unos 150 Ma) (Bandel y Heidelberg, 2002). Estos datos vienen a coincidir con los obtenidos mediante reloj molecular por Jörger *et al.* (2010), quienes señalan que los principales grupos de opistobranquios se originaron en el Mesozoico, y que algunos de los grupos de Panpulmonata (Sacoglossa, Acochlidia, Pyramidelloidea y Glacidorboidea) aparecieron en la transición Pérmico/Triásico (hace unos 250 Ma), mientras que sitúan la aparición los verdaderos pulmonados (Eupulmonata) en el Jurásico (hace unos 190 Ma).



40

1.4 COLONIZACIÓN DE LOS HÁBITATS QUIMIOAUTÓTROFOS

Desde el descubrimiento de las comunidades biológicas asociadas a las emisiones hidrotermales submarinas en 1977, los gasterópodos han sido objeto de una especial atención como uno de sus principales componentes, junto a los bivalvos vesicomíidos y batimodiólidos, poliquetos siboglínidos (vestmentíferos) y los camarones bresílicos (Little y Vrijenhoek, 2003). Desde su descubrimiento, la descripción de nuevos grupos y especies de gasterópodos no ha cesado, así como los estudios dedicados a los más diversos aspectos sobre los mismos (fisiología, desarrollo larvario, dispersión, conectividad, bacterias simbiotes), por lo que resultaría muy prolijo hacer aquí un repaso exhaustivo (Sasaki *et al.* 2010 ofrecen una revisión muy completa, precedida por otras anteriores, como las de Warén y Bouchet, 2001 o Desbruyères *et al.*, 2007).

Lo cierto es que el descubrimiento y estudio de estos gasterópodos, que en algunos casos correspondían a grupos nuevos endémicos de las comunidades quimioautótrofas, ha impulsado notablemente las investigaciones sobre anatomía comparada, evolución y filogenia de los gasterópodos, con un ingente número de artículos, cuyo ritmo de publicación se mantiene hoy día.

Aparte de algunos grupos de gasterópodos exclusivos de estos ambientes, también se encuentran en ellos muchos representantes de diversas superfamilias no endémicas de este tipo de hábitats (Seguenzioidea, Trochoidea, Fissurelloidea, Scissurelloidea, Lepetelloidea, Neritoidea, Buccinoidea, Conoidea o Valvatoidea), lo que sugiere que han sido colonizados independientemente por diferentes linajes de gasterópodos a lo largo de la evolución. Entre los grupos de gasterópodos exclusivos de los ambientes quimioautótrofos destaca todo un “orden”, Neomphalina (aunque el rango taxonómico no está todavía definido), que comprende tres familias (Neomphalidae, Melanodrymiidae y Peltospiridae). Además, también son típicos de estas comunidades la superfamilia Aabysochrysoidea (dentro de los

Caenogastropoda), que comprende dos familias (Abyssochrysidae y Provannidae), las familias Neolepetopsidae y Pectinodontidae (dentro de los Patellogastropoda), y Pyropeltidae, Lepetodrilidae y Sutilizonidae (dentro de los Vetigastropoda). Mientras muchas de las especies y algunos géneros asociados a las fumarolas profundas presentan una distribución muy restringida (lo que indica una escasa capacidad de dispersión), los taxones de rango superior presentan una distribución global por todas las zonas volcánicamente activas de los fondos oceánicos, lo que sugiere una relación muy antigua con estos ambientes reductores (McArthur y Koop, 1999). Para los grupos endémicos se sugirió inicialmente un origen muy antiguo (Newman, 1985; Tunnicliffe, 1992; McArthur y Tunnicliffe, 1998), aduciendo que estos hábitats pudieron actuar como refugio ante las extinciones masivas debido a su autonomía con respecto a la fuente de energía. Sin embargo, ello ha sido objeto de controversias. Little y Vrijenhoek (2003) repasan las evidencias existentes, tanto del registro fósil como de las filogenias moleculares, y, a pesar de las discrepancias, los datos parecen indicar un origen más reciente de los grupos actuales asociados a los medios quimiorreductores y que la composición taxonómica de estas comunidades ha cambiado a lo largo del tiempo. El registro fósil de estos gasterópodos se remonta al Jurásico Superior o Cretácico Inferior, lo que situaría su origen a finales del Mesozoico (o incluso en el Cenozoico) a partir de ancestros no endémicos de los ambientes hidrotermales (Warén y Bouchet, 2001; Little y Vrijenhoek, 2003; Kiel y Little, 2006). Por otro lado, la calibración de los relojes moleculares, aunque partiendo de filogenias con poco soporte, también parece indicar un origen relativamente reciente de estos grupos (McArthur y Koop, 1999; Johnson *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista filogenético, en la actualidad se acepta comúnmente la pertenencia de las familias Neolepetopsidae y Pectinodontidae a los Patellogastropoda, y de las familias Pyropeltidae, Lepetodrilidae y Sutilizonidae a los Vetigastropoda, aunque en este último caso sus relaciones internas siguen sin ser

aclaradas. Asimismo, la posición de los Neomphalina sigue siendo objeto de debate y todavía no existe acuerdo sobre si se trata de un clado independiente (p. ej., Heß *et al.*, 2008; Aktipis *et al.*, 2012) o incluido dentro de los Vetigastropoda (p. ej., Bouchet y Rocroi, 2005; Geiger *et al.*, 2008). En lo referente a la superfamilia Abysochrysoidea, en la actualidad se considera que está constituida por dos familias con representantes actuales: Abysochrysidae (con un único género actual) y Provannidae, que incluye a los géneros actuales *Ifremeria*, *Provanna*, *Alviniconcha*, *Cordesia* y *Desbruyeresia* (Sasaki *et al.*, 2010). Además, se incluye en esta superfamilia a la familia fósil Hokkaidoconchidae (Kaim *et al.*, 2008), así como al género actual *Rubyspira*, descubierto recientemente en huesos de ballenas (Johnson *et al.*, 2010).

Dentro de los Caenogastropoda, la superfamilia Abysochrysoidea fue considerada inicialmente por Warén y Ponder (1991) como miembros relictos de los extintos Loxonematoidea (posibles antecesores de los Caenogastropoda). Posteriormente, Bouchet y Rocroi (2005) los situaron dentro de lo que denominaron “grupo zigopleuroideo”, de posición taxonómica incierta. Por otro lado, los análisis filogenéticos basados en caracteres morfológicos situaban a la familia Provannidae como grupo hermano de Littorinidae, y estrechamente relacionada con Eatoniellidae y Cingulopsidae (Ponder y Lindberg, 1997; Ponder *et al.*, 2008). Asimismo, tanto los estudios ultraestructurales del esperma (Healy, 1990) como la filogenia molecular de Colgan *et al.* (2007, basada en el gen mitocondrial *rrnL*) indicaban una posición cercana de Provannidae y Littorinidae. No obstante, la posición filogenética de los Abysochrysoidea, así como su origen, permanecen sin resolver y requieren de nuevos estudios moleculares que proporcionen un soporte robusto y permitan estimar su origen a partir de un adecuado reloj molecular. Por este motivo, en la presente tesis se ha abordado el estudio del genoma mitocondrial completo de un representante de esta superfamilia, *Ifremeria nautiliei* Bouchet y Warén, 1991. Se trata de uno de los gasterópodos de mayor tamaño y dominante en las comunidades de las fumarolas

submarinas del Pacífico suroeste, y que ha sido objeto de estudios filogeográficos y de conectividad entre sus poblaciones (Kojima *et al.*, 2000; Thaler *et al.*, 2011; Hidaka *et al.*, 2012).

1.5 LOS APLACOPHORA Y EL HIPOTÉTICO MITOGENOMA DEL MOLUSCO ANCESTRAL

La filogenia de los moluscos sigue siendo hoy día objeto de un intenso debate. Se han propuesto diversas hipótesis sin que ninguna de ellas sea mayoritariamente aceptada (véase el apartado 4.2. de la discusión). Tradicionalmente se dividía a los moluscos en dos grandes grupos, los Aplacophora (moluscos vermiformes sin concha), por un lado, y los Testaria (moluscos con concha), por otro (Salvini-Plawen y Steiner, 1996; Haszprunar, 2000; Salvini-Plawen, 2006; Haszprunar & Ruthensteiner, 2013). Los Aplacophora reúnen a dos de las denominadas clases menores: Caudofoveata (o Chaetodermatomorpha) y Solenogastres (o Neomeniomorpha), y los Testaria que agrupaba a las otras seis clases. Esta propuesta considera la morfología simple de los aplacóforos como la ancestral de los moluscos y a ambas clases como las más basales. Algunos autores han considerado que forman un grupo monofilético (Scheltema, 1993; Ivanov, 1996), mientras que otros consideran que ambas clases constituyen un grado parafilético (Haszprunar, 2000; Salvini-Plawen, 2003; Haszprunar *et al.*, 2008; Faller *et al.*, 2012), controversia que todavía está pendiente de ser resuelta (Todt, 2013). Otros autores, sin embargo, sostienen que los aplacóforos constituyen un clado derivado de un antecesor poliplacóforo por la pérdida secundaria del pie y de las placas dorsales (Scheltema 1993; Ivanov, 1996; Scheltema e Ivanov, 2002; Sutton *et al.*, 2012; Vinther *et al.*, 2012).

Lo cierto es que no hay acuerdo todavía en cuál de las clases de moluscos con representantes actuales sería la más primitiva. El conocimiento del genoma mitocondrial completo en las distintas clases de moluscos y su comparación con el de

otros Bilateria podría contribuir a resolver el enigma, y establecer un hipotético mitogenoma del molusco ancestral. Sin embargo, por ahora no se ha publicado ningún mitogenoma de representantes de las clases Caudofoveata, Solenogastres y Monoplacophora, lo que impide realizar dichas inferencias. Por este motivo, en la presente tesis se ha secuenciado el genoma mitocondrial completo de un aplacóforo para contribuir a dilucidar la hipotética secuencia del molusco ancestral, dado que el mitogenoma de los Caenogastropoda se considera poco derivado, y para establecer el grupo hermano más adecuado de los Gastropoda.

1.6 LOS CAENOGASTROPODA

Los Caenogastropoda son uno de los cinco grandes clados de gasterópodos con representantes actuales y el que más taxones comprende (más de la mitad de las especies, unas 136 familias actuales, unas 65 extinguidas, y cientos de géneros agrupados en 41 superfamilias, según la clasificación propuesta por Bouchet y Rocroi (2005). Su enorme radiación adaptativa ha dado lugar a multitud de formas y hábitos de vida y han invadido casi todos los hábitats (marinos, terrestres y dulceacuícolas), incluyendo las fuentes hidrotermales profundas (ver apartado anterior). Su concha ha adoptado las formas más variadas (pateliformes, tubulares y espirales de todo tipo), e incluso puede llegar a faltar. Incluye a los grupos más conocidos de gasterópodos.

El taxon Caenogastropoda fue propuesto por Cox (1960) como un orden de Prosobranchia que agrupaba a los Mesogastropoda y a los Stenoglossa (= Neogastropoda). La denominación Caenogastropoda no fue apenas utilizada posteriormente hasta el trabajo de Salvini-Plawen (1980), pero fue Haszprunar (1985b) el primer autor que proporcionó una definición basada en sinapomorfías.

1.6.1 CLASIFICACIÓN Y FILOGENIA (RELACIONES INTERNAS)

La sistemática actual de este gran clado sigue principalmente las conclusiones de la filogenia general de los gasterópodos de Ponder y Lindberg (1997) basada en caracteres morfológicos. Sin embargo, los datos disponibles hoy día indican que algunos de los taxones de rango superior (órdenes y subórdenes) que lo componen probablemente sean parafiléticos, e incluso polifiléticos (Colgan *et al.*, 2007) y las relaciones de muchos de los taxones intermedios (superfamilias y familias) permanecen sin resolver. El primer análisis cladístico centrado en los Caenogastropoda fue publicado por Strong (2003). Dicha investigadora estudió en detalle 16 especies y basó su análisis en caracteres morfológicos, con especial énfasis en el aparato digestivo. Posteriormente, Colgan *et al.* (2007) abordaron la filogenia de los Caenogastropoda mediante el análisis de la secuencia de seis genes en 29 especies que representaban los principales linajes. Poco después, Ponder *et al.* (2008) publicaron una síntesis de los conocimientos existentes hasta la fecha sobre este gran clado de gasterópodos y presentaron un cladograma combinando caracteres morfológicos (incluyendo ultraestructurales) y moleculares. Finalmente, Simone (2011) presentó una filogenia de los Caenogastropoda basada en un extenso estudio comparativo de los caracteres morfológicos.

Por otro lado, son numerosos los trabajos que abordan el estudio filogenético de diversos taxones dentro de Caenogastropoda y que aportan contribuciones para el entendimiento de la filogenia general del grupo. Entre otros, pueden citarse los centrados en los Architaenioglossa (Harasewych *et al.*, 1997; Simone, 2004), Rissooidea (Ponder, 1988; Criscione y Ponder, 2013; Wilke *et al.*, 2013), Cerithioidea (Lydeard *et al.*, 2002; Simone, 2001; Strong *et al.*, 2011), Calyptraeidea (Simone, 2002), Muricidae (Oliverio *et al.*, 2002), Eulimoidea (Takano y Kano, 2014), Stromboidea y Xenophoroidea (Simone, 2005), Cypraeidae (Meyer, 2003, 2004),

Neogastropoda (Kantor, 1996; Harasewych *et al.*, 1997; Cunha *et al.*, 2009), y Conoidea (Puillandre *et al.*, 2008, 2011).

La mayor parte de las filogenias publicadas, con pocas excepciones, reconocen la monofilia de los Caenogastropoda, y dentro de ellos se han venido reconociendo una serie de taxones de rango superior que se mencionan a continuación.

ARCHITAENIOGLOSSA

Agrupan a tres superfamilias de divergencia temprana en el árbol de los caenogasterópodos y que son exclusivas de los medios dulceacuícola (Ampullarioidea y Viviparoidea) y terrestre (Cyclophoroidea). Los Architaenioglossa fueron elevados al rango de orden por Golikov y Starobogatov (1975) y Ponder y Warén (1988) y la mayor parte de los autores los consideran un linaje que divergió de los Caenogastropoda en una fase muy temprana, constituyendo el grupo hermano de éstos (p. ej., Ponder y Lindberg, 1996, 1997). La filogenia morfológica de Strong (2003) apoya la monofilia de este taxón; sin embargo, son mayoritarios los estudios que cuestionan su monofilia (Salvini-Plawen y Steiner, 1996; Harasewych *et al.*, 1998; Simone, 2004; Ponder *et al.*, 2008; Zapata *et al.*, 2014) y señalan la ausencia de sinapomorfías que los unan más allá de su hábitat no marino. Por tanto, los Architaenioglossa no constituirían un clado, sino un grado, siendo tres linajes que divergieron de los Caenogastropoda en una etapa temprana por su invasión independiente de los medios dulceacuícola y terrestre. Por otro lado, sus relaciones con otros grupos de divergencia temprana de caenogasterópodos, como Campaniloidea o Cerithioidea, no están todavía resueltas.

SORBEOCONCHA

Este taxon fue establecido por Ponder y Lindberg (1997) para agrupar a todos los Caenogastropoda excepto a los Architaenioglossa. El análisis filogenético combinado (morfológico y molecular) de Ponder *et al.* (2008) apoya la monofilia de los

Sorbeoconcha, con Campaniloidea como grupo hermano del resto, de los cuales a su vez, los Cerithioidea serían el primer grupo en divergir.

HYPSOGASTROPODA

Incluye a todos los Caenogastropoda, menos a los grupos mencionados anteriormente (Architaenioglossa, Campaniloidea y Cerithioidea), y se suele situar a los Cerithioidea como su grupo hermano. Son considerados los “cenogasterópodos avanzados” (“higher Caenogastropods”) por Ponder y Lindberg (1997), en contraposición a los “caenogastrópodos basales” (“lower caenogastropods”), que según Healy (1996) comparten una morfología espermática “primitiva” (probablemente simplesiomórfica). Dentro de este gran clado suelen considerarse otra serie de taxones de rango superior, algunos de los cuales se solapan, y que se comentan a continuación, como son los Littorinimorpha, Neotaenioglossa, Ptenoglossa, Heteropoda o Neogastropoda. Asimismo, Ponder *et al.* (2008), en su análisis combinado, obtienen dos clados principales dentro de los Hypsogastropoda: uno monofilético formado por los cenogasterópodos que poseen un sifón anterior inhalante (“Siphonate group”), y otro polifilético formado por aquellos que carecen de él (“Asiphonate group”) más los Triphoroidea, en los cuales el sifón inhalante no sería, por tanto, homólogo del de los otros cenogasterópodos sifonados (Ponder *et al.*, 2008).

NEOTAENIOGLOSSA

Esta denominación fue utilizada por Haszprunar (1988) y por Ponder y Warén (1988), pero con diferentes conceptos. Estos últimos autores lo emplearon para incluir a todos los “mesogasterópodos” no arquitaenioglossos, por lo que equivaldría a los Sorbeoconcha, mientras que el primero excluía también a Campaniloidea, Cerithioidea y Ptenoglossa. Se trata de un taxón en desuso hoy día.

LITTORINIMORPHA

Bouchet y Rocroi (2005) propusieron el término Littorinimorpha para englobar a los Hypsogastropoda con rádula tenioglosa. Se corresponderían con los Mesogastropoda tradicionales, excluyendo a los grupos primitivos (Architaenioglossa, Campaniloidea y Cerithioidea). Por tanto, equivaldría con ligeras modificaciones a los Neotaenioglossa, pero constituyen un grupo parafilético.

HETEROPODA

Tradicionalmente los gasterópodos holoplanctónicos se han dividido en dos grupos, Pterópodos y Heterópodos. El primero incluye a dos órdenes de heterobranquios (Thecosomata y Gymnosomata), mientras que el segundo está formado por una sola superfamilia de cenogasterópodos (Pterotracheoidea = Carinarioidea), incluido en Littorinimorpha por Bouchet y Rocroi (2005).

PTENOGLOSSA

Ya presente en la clasificación de Thiele, incluye a tres grupos de cenogasterópodos (Eulimoidea, Janthinoidea y Triphoroidea) adaptados a alimentarse por succión, con una probóscide acrembólica y una rádula modificada. Se considera un grupo polifilético, de acuerdo con la mayor parte de las filogenias publicadas (p. ej., Takano y Kano, 2014).

NEOGASTROPODA

Suele considerarse como el gran clado terminal (el más derivado) de los Caenogastropoda, cuyos miembros son casi exclusivamente marinos y carnívoros, y es el único que perdura de la clasificación tradicional de Thiele (1929-1931). A este grupo pertenecen familias tan conocidas y diversas como Muricidae, Volutidae, Buccinidae, Conidae, Mitridae, Cancellaridae o Terebridae. Generalmente se considera a los Neogastropoda monofiléticos, para los que se han descrito una serie de sinapomorfías morfológicas relacionadas con el aparato digestivo (Kantor, 1996; Ponder y Lindberg, 1996, 1997; Strong, 2003). Sin embargo, la monofilia de este gran

clado no es apoyada por algunas de las filogenias moleculares, como la obtenida por Colgan *et al.* (2007) o las basadas en los genomas mitocondriales completos (Cunha *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2013). En estas últimas, los Tonnoidea se recuperan en una posición intermedia entre los Cancellarioidea y el resto de los neogasterópodos, mientras que en la filogenia obtenida por Colgan *et al.* (2007) los Volutoida se sitúan junto a los Tonnoidea. El origen y radiación de los Neogastropoda representa un evento de gran importancia dentro de la historia evolutiva de los Caenogastropoda, pero la identificación de su grupo hermano sigue sin estar resuelta.

APOGASTROPODA

La mayor parte de los morfólogos considera a los Caenogastropoda como grupo hermano de los Heterobranchia, por lo que estos dos grandes clados de gasterópodos (los más diversificados) conforman los Apogastropoda, taxon propuesto por Salvini-Plawen y Haszprunar (1987). Este grupo no se recupera generalmente en las filogenias moleculares basadas en genomas mitocondriales (debido a problemas de atracción de ramas largas asociados a los Heterobranchia; Grande *et al.* 2008), pero sí en las basadas en datos nucleares (Atkypis y Giribet, 2012; Zapata *et al.* 2014).

1.6.2 ORIGEN Y REGISTRO FÓSIL DE LOS CAENOGASTROPODA

Los caracteres de la protoconcha tienen un gran valor taxonómico y filogenético y son importantes a la hora de asignar taxones extintos a los Caenogastropoda (Bandel, 1982, 1993; Fryda, 1999; Kaim, 2004; Nützel y Hua-Zhang, 2005; Fryda, 2012). Asimismo, el tipo de protoconcha (multiespiral o pauciespiral) es indicativo del tipo de desarrollo larvario (planctotrófico o lecitotrófico, respectivamente). De acuerdo con Nützel *et al.* (2007) no se conocen conchas larvarias planctotróficas en el Cámbrico, pero aparecen ya en el Ordovícico. Por tanto, dichos autores asumen que el desarrollo planctotrófico en los gasterópodos se originó en la transición del Cámbrico al Ordovícico, al menos en los linajes que dieron lugar a los Neritimorpha y

Caenogastropoda, mientras que Patellogastropoda y Vetigastropoda carecen de protoconchas planctotróficas. Se considera, por tanto, que una protoconcha multiespiral ortostrófica es exclusiva de los Caenogastropoda, pues en los Heterobranchia la protoconcha es levógira (heterostrófica). Por otro lado, aunque los Neritimorpha también pueden presentar una protoconcha planctotrófica y heterostrófica, su tipo de enrollamiento es muy particular (ver Bandel, 1982). Sin embargo, en algunos grupos paleozoicos es difícil establecer si se trata de neritimorfos o cenogasterópodos (Nützel *et al.*, 2008).

Los primeros Caenogastropoda posiblemente aparecieron durante la radiación del Ordovícico Inferior (hace unos 490 Ma) (p. ej., Loxonematidae, Subulitidae), pero su identificación como tales no puede ser confirmada, ya que no conservan la protoconcha. Es probable que el ancestro común de los cenogasterópodos actuales viviera en el Paleozoico, pues presentan un amplio registro fósil en el Devónico. Fryda (1999) asume que los Caenogastropoda y Heterobranchia (Apogastropoda) surgieron a partir de los Perunelomorpha, un grupo presente en la transición del Ordovícico al Devónico caracterizado por una protoconcha de enrollamiento abierto de las primeras vueltas y una teloconcha fusiforme. Este tipo de protoconcha se interpreta como el estado plesiomórfico de los Caenogastropoda (Nützel y Fryda, 2003) y que desaparece en el Mesozoico. Bandel (2002) incluyó los Perunelomorpha en los Procaenogastropoda, un conjunto heterogéneo y poco caracterizado de grupos paleozoicos. Sin embargo, las relaciones de estos grupos entre sí, así como con los cenogasterópodos mesozoicos y actuales es objeto de controversia entre los paleontólogos (ver p. ej., Bandel, 1993; Kaim, 2004; Nützel y Hua-Zhang, 2005). Kaim (2004) señala a los Pseudozygopleuridae, presentes en el Devónico Inferior, como posible ancestro del resto de los Caenogastropoda posteriores.

El evento de extinción masiva que tuvo lugar a finales del Pérmico (hace unos 250 Ma) tuvo un gran impacto en los Caenogastropoda, con la desaparición de buena

parte de las familias del Paleozoico (Nützel y Erwin, 2002; Nützel, 2005). La diversidad de los Caenogastropoda se incrementó notablemente en el Jurásico y, sobre todo, durante el Cretácico con la gran radiación de los Neogastropoda, propiciada aparentemente por la evolución de los modos alimenticios depredadores y su progresiva especialización (Taylor *et al.*, 1980). Con posterioridad se produjo una recuperación progresiva con la aparición de nuevas familias. Bandel (1993, 2002) ofreció una completa revisión de los Caenogastropoda del Mesozoico ; este autor los divide en función del periodo de aparición (y no por sus relaciones filogenéticas) en Paleo-Caenogastropoda (de origen paleozoico), Meta-Mesogastropoda (de origen jurásico) y Neo-Mesogastropoda (originados en el Cretácico). Por otro lado, considera a los Neogastropoda, cuyo origen sitúa en el Cretácico Inferior. Las primeras superfamilias con representantes actuales, como Cerithioidea, Rissooidea y Littorinoidea, presentan un registro fósil desde el Mesozoico Inferior o, incluso, desde el Paleozoico Superior (Bandel, 1993; Kaim, 2004), las cuales fueron asignadas por Bandel (1993) a los Paleo-Caenogastropoda. A principios del Jurásico (hace unos 190 Ma) aparecen muchas otras de las superfamilias actuales (p. ej., Triphoroidea, Janthinoidea, Stromboidea), y otras (p. ej., Calyptraeidea, Capuloidea) en el Cretácico Inferior.

Por otro lado, la extinción masiva del final del Cretácico no tuvo demasiado impacto en la evolución de los Caenogastropoda, pues persistieron buena parte de las familias. Algunos de los grupos altamente diversificados en la actualidad como los rissooideos o los neogasterópodos comenzaron su gran radiación en el Cretácico, que continuó en el Cenozoico. Sin embargo, otras familias, como Campanilidae o Aporrhaidae, que habían sido muy diversas durante el Mesozoico Superior y Cenozoico Inferior han quedado reducidas en la actualidad a muy escasos representantes (Ponder *et al.*, 2008), o a una sola especie en el caso de Campanilidae.

En lo que se refiere a los Neogastropoda, Kaim (2004) sugiere a la familia Maturifusidae (presente en el Triásico-Jurásico) como precursora de los representantes actuales. El primer registro fósil de los muricoideos y buccinoideos se sitúa en el Cretácico Inferior (hace unos 140 Ma) (Tracey *et al.*, 1993), aunque Bandel (1993) considera una aparición más tardía de los murícidos (hace unos 100 ma, en el periodo Cenomaniano, al comienzo del Cretácico Superior), al igual que los Cancellarioidea. Por su parte, los primeros Conoidea se conocen desde el final del Cretácico (hace unos 70 ma, en la transición del periodo Campaniano al Maastrichtiano) (Bandel, 1993), mientras que el primer representante de la familia Conidae procede del Eoceno, hace unos 50 Ma (Kohn, 1990).

1.6.3 RELACIONES EXTERNAS DE LOS CAENOGASTROPODA

Como se ha comentado, se considera que los Caenogastropoda son el grupo hermano de los Heterobranchia, componiendo ambos taxones el clado Apogastropoda, lo cual es apoyado tanto en filogenias morfológicas (Ponder y Lindberg, 1997; Aktipis *et al.*, 2008; Ponder *et al.*, 2008) como en moleculares basadas en genes nucleares (Tillier *et al.*, 1992; McArthur y Harasewych, 2003; Smith *et al.*, 2011; Kocot *et al.* 2011; Zapata *et al.*, 2014), o en matrices de datos combinados (Aktipis *et al.*, 2008; Ponder *et al.*, 2008). Por otro lado, suele considerarse a los Neritimorpha como grupo hermano de los Apogastropoda (McArthur y Harasewich, 2003; Aktipis *et al.*, 2008; Kocot *et al.*, 2011; Zapata *et al.*, 2014), aunque la filogenia molecular de Ponder y Lindberg (1997) señala a los Vetigastropoda como clado hermano.

Sin embargo, las filogenias moleculares de los gasterópodos publicadas hasta la fecha y basadas en el genoma mitocondrial completo contradicen lo anterior. Grande *et al.* (2008) y Arquez *et al.* (2014) sitúan a los Patellogastropoda como grupo hermano de los Heterobranchia, mientras que los Caenogastropoda aparecen más relacionados con Vetigastropoda y Neritimorpha en un clado aparte, lo cual también es

apoyado por la filogenia de Williams *et al.* (2014). Por otro lado, mientras Grande *et al.* (2008) obtienen a Vetigastropoda y Caenogastropoda como grupos hermanos y, a su vez, a los Neritimorpha como grupo hermano de ambos, Arquez *et al.* (2014) y Williams *et al.* (2014) hallan una estrecha relación entre Vetigastropoda y Neritimorpha, como grupos hermanos y, a su vez, el clado formado por ambos como grupo hermano de los Caenogastropoda. Por tanto, los análisis mitogenéticos sugieren una divergencia temprana de los Vetigastropoda + Neritimorpha + Caenogastropoda, por un lado, y de los Heterobrahcia, por otro. Ello deriva de que el genoma mitocondrial de los Vetigastropoda, Neritimorpha y Caenogastropoda no ha sufrido modificaciones significativas con respecto al mitogenoma de los moluscos primitivos (p. ej., Polyplacophora), mientras que el de Patellogastropoda y Heterobranchia ha sufrido reorganizaciones importantes que causan ramas largas y sesgos en la inferencia filogenética (Grande *et al.*, 2008).



2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Con se ha comentado en la introducción, la filogenia de los gasterópodos y, en concreto, la de los Caenogastropoda, sigue siendo objeto de un notable debate. Las filogenias publicadas hasta la fecha, ya sean morfológicas, moleculares o combinadas, muestran en muchos casos una escasa resolución e importantes desacuerdos entre unas y otras.

Por ello, el objetivo general de la presente tesis es contribuir al esclarecimiento de la evolución de los Cenogastropoda (grupo central y más diversificado dentro de los Gastropoda) a través de un análisis filogenético robusto basado en secuencias completas del genoma mitocondrial. A partir de este análisis se pretende identificar los principales linajes de Caenogastropoda, dilucidar sus relaciones filogenéticas (tanto externas como internas) y testar la monofilia o polifilia de los distintos clados de rango superior propuestos hasta la fecha, tales como Architaenioglossa, Sorbeoconcha, Hysogastropoda, Neotaenioglossa, Littorinimorpha, Neogastropoda o Apogastropoda.

Para la consecución de este objetivo general se han planteado una serie de objetivos parciales que se detallan a continuación.

1. Dado el escaso porcentaje de especies de Caenogastropoda cuyo genoma mitocondrial se ha secuenciado, el primer objetivo de la tesis ha sido aportar nuevos mitogenomas de especies pertenecientes a linajes no representados hasta ahora.

1.1. Incorporar el mitogenoma de un Aplacophora a la colección de genomas mitocondriales publicados con anterioridad, lo que permitirá a) estudiar el ordenamiento génico mitocondrial de las diferentes clases de moluscos y dilucidar el posible ordenamiento de un molusco ancestral y de un gasterópodo ancestral, b) analizar las relaciones externas de los Gastropoda y así, c) seleccionar el grupo externo más apropiado para el análisis molecular tanto de los Gastropoda como de los Caenogastropoda (hasta ahora se usan los cefalópodos, siendo un grupo divergente

en el árbol de los moluscos y no necesariamente el grupo hermano de gasterópodos). La especie seleccionada ha sido *Scutopus ventrolineatus* Salvini-Plawen, 1968 (Mollusca, Chaetodermomorpha).

1.2. Secuenciar el genoma mitocondrial de una especie de la superfamilia Cyclophoroidea (Architaenioglossa). Los Architaenioglossa son considerados como la primera rama de Caenogastropoda que divergió del resto. Este taxon (o grado) está constituido por tres superfamilias, dos de ellas exclusivamente dulceacuícolas (Ampullaroidea y Viviparoidea), de las cuales ya se conocen algunos mitogenomas, y una tercera exclusivamente terrestre (Cyclophoroidea), de la que no se posee ningún mitogenoma completo. Las relaciones entre estas tres superfamilias entre sí y con otros Caenogastropoda basales (Campaniloidea, Cerithioidea) son objeto de controversia (como se ha comentado en la introducción). Por ello, el nuevo mitogenoma que aquí se aporta permitirá aportar más luz sobre el origen y evolución temprana de los Caenogastropoda. La especie seleccionada ha sido *Cochlostoma hidalgoi* (Crosse, 1864) (Architaenioglossa, Cyclophoroidea, Diplommatinidae).

1.3. Secuenciar el genoma mitocondrial de una especie de la superfamilia Abyssochrysoidea. Se trata de la única familia endémica de las comunidades quimioautótrofas profundas, cuyo origen y relaciones son inciertas. Se ha seleccionado una de las especies más representativas de estos ambientes en las surgencias termales del Pacífico: *Ifremeria nautili* Bouchet y Warén, 1991 (Abyssochrysoidea, Provannidae). Con la incorporación de este mitogenoma a los análisis se pretende averiguar si esta superfamilia corresponde a un grupo antiguo relictos que sobrevivió a las extinciones masivas o si deriva de un grupo más moderno y adaptado de forma secundaria a estos ambientes.

1.4. Secuenciar el genoma mitocondrial de representantes de superfamilias importantes agrupadas provisionalmente en el taxon informal "Littorinimorpha" y de las

que no se conociera ningún mitogenoma. Se seleccionaron *Naticarius hebraeus* (Martyn, 1786) (Naticoidea, Naticidae), *Erosaria spurca* (Linnaeus, 1758) (Cypraeoidea, Cypraeidae) y *Galeodea echinophora* (Linnaeus, 1758) (Tonnoidea, Cassidae).

1.5. Secuenciar el mitogenoma de un Neogastropoda de la familia Columbelloidea (superfamilia Buccinoidea). Los buccínidos reúnen a un grupo heterogéneo de familias, una de las cuales, Columbelloidea, ha evolucionado de forma secundaria hacia el herbivorismo y no se conoce el mitogenoma de ninguna especie de la misma. Se ha seleccionado la especie *Columbella adansoni* Menke, 1853.

2. Con los nuevos mitogenomas obtenidos más todos aquellos disponibles en la literatura realizar un análisis filogenético, incluyendo representantes de linajes externos de moluscos adecuados. Dicho análisis será el que permita abordar el objetivo general antes expuesto.

3. Con todo lo anterior se pretende abordar nuevos datos sobre el ordenamiento génico del mitogenoma de los Caenogastropoda y sobre su evolución.



3. Resultados

3. RESULTADOS

La metodología utilizada para la obtención de los objetivos y resultados de esta tesis vienen detallados en cada uno de los tres capítulos que vienen a continuación.

3.1 PUBLICACIÓN 1: THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF *SCUTOPUS VENTROLINEATUS* (MOLLUSCA: CHAETODERMOMORPHA) SUPPORTS THE ACULIFERA HYPOTHESIS

Título: "The complete mitochondrial genome of *Scutopus ventrolineatus* (Mollusca: Chaetodermomorpha) supports the Aculifera hypothesis"

Autores: David Osca, Iker Irisarri, Christiane Todt, Cristina Grande, Rafael Zardoya

Estado: Publicado

Año: 2014

Revista: BMC Evolutionary Biology, 14: 197

Resumen:

"El genoma completo de *Scutopus ventrolineatus* (Mollusca: Chaetodermomorpha) soporta la hipótesis Aculífera"

Con más de 100.000 especies vivientes, los moluscos son el segundo filo de metazoos con mayor diversidad. La clasificación actual de los moluscos reconoce ocho clases (Neomeniomorpha, Chaetodermomorpha, Polyplacophora, Monoplacophora, Cephalopoda, Gastropoda, Bivalvia y Scaphopoda) que muestran una morfología muy variable. Las relaciones filogenéticas entre las diferentes clases de moluscos han sido y siguen siendo polémicas debido a la falta de sinapomorfías morfológicas irrefutables. Los estudios filogenéticos recientes basados en datos multigénicos están mostrando resultados prometedores pero no concluyentes. En este

sentido, los genomas mitocondriales completos han sido utilizados ampliamente para reconstruir filogenias profundas. En los moluscos, se conoce el genoma mitocondrial completo en diversas especies de gasterópodos, bivalvos y cefalópodos, pero de muy pocos representantes, o ninguno, en el caso de las clases menores.

En el presente trabajo se aporta la secuencia completa (14662 pb) del genoma mitocondrial del Chaetodermomorpha *Scutopus ventrolineatus* Salvini-Plawen, 1968. Comparada con la de otros moluscos, la posición relativa de los genes codificantes de proteínas en el genoma mitocondrial de esta especie es muy similar a la conocida en Polyplacophora, Cephalopoda y linajes basales de Bivalvia y Gastropoda (Vetigastropoda y Neritimorpha, pero no Patellogastropoda). El árbol filogenético reconstruido basado en datos mitocondriales y nucleares recuperó la monofilia de Aplacophora, Aculifera y Conchifera. Dentro de los Conchifera, los Cephalopoda resultaron grupo hermano de Gastropoda y Bivalvia + Scaphopoda.

El análisis filogenético de las secuencias mitocondriales mostró una alta heterogeneidad entre linajes, lo que produce una tendencia a la atracción de ramas largas. La eliminación de esas ramas largas mejoró pero no resolvió por completo el problema. Los mejores resultados a nivel de soporte estadístico se obtuvieron cuando se concatenaron secuencias mitocondriales y nucleares en un análisis combinado.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The complete mitochondrial genome of *Scutopus ventrolineatus* (Mollusca: Chaetodermomorpha) supports the Aculifera hypothesis

David Osca¹, Iker Irisarri^{1,2}, Christiane Todt³, Cristina Grande⁴ and Rafael Zardoya^{1*}

Abstract

Background: With more than 100000 living species, mollusks are the second most diverse metazoan phylum. The current taxonomic classification of mollusks recognizes eight classes (Neomeniomorpha, Chaetodermomorpha, Polyplacophora, Monoplacophora, Cephalopoda, Gastropoda, Bivalvia, and Scaphopoda) that exhibit very distinct body plans. In the past, phylogenetic relationships among mollusk classes have been contentious due to the lack of indisputable morphological synapomorphies. Fortunately, recent phylogenetic analyses based on multi-gene data sets are rendering promising results. In this regard, mitochondrial genomes have been widely used to reconstruct deep phylogenies. For mollusks, complete mitochondrial genomes are mostly available for gastropods, bivalves, and cephalopods, whereas other less-diverse lineages have few or none reported.

Results: The complete DNA sequence (14662 bp) of the mitochondrial genome of the chaetodermomorph *Scutopus ventrolineatus* Salvini-Plawen, 1968 was determined. Compared with other mollusks, the relative position of protein-coding genes in the mitochondrial genome of *S. ventrolineatus* is very similar to those reported for Polyplacophora, Cephalopoda and early-diverging lineages of Bivalvia and Gastropoda (Vetigastropoda and Neritimorpha; but not Patellogastropoda). The reconstructed phylogenetic tree based on combined mitochondrial and nuclear sequence data recovered monophyletic Aplacophora, Aculifera, and Conchifera. Within the latter, Cephalopoda was the sister group of Gastropoda and Bivalvia + Scaphopoda.

Conclusions: Phylogenetic analyses of mitochondrial sequences showed strong among-lineage rate heterogeneity that produced long-branch attraction biases. Removal of long branches (namely those of bivalves and patellogastropods) ameliorated but not fully resolved the problem. Best results in terms of statistical support were achieved when mitochondrial and nuclear sequence data were concatenated.

Keywords: Mitogenomics, Nuclear ribosomal proteins, Caudofoveata, Aculifera, Aplacophora

Background

Mollusks are the second largest animal phylum with more than 100000 described extant species and are grouped into eight classes: Solenogastres or Neomeniomorpha, Caudofoveata or Chaetodermomorpha, Polyplacophora, Monoplacophora, Bivalvia, Gastropoda, Cephalopoda, and Scaphopoda [1-3]. Morphology-based classifications consider Neomeniomorpha and Chaetodermomorpha as the earliest branching lineages within mollusks because they lack many typical features of mollusks, among which the

most conspicuous is the shell [4]. Whether they form a monophyletic group named Aplacophora [5,6] or a paraphyletic grade [7-10] is still a matter of debate [11]. Some authors [12-14] place Polyplacophora (chitons) as sister group of Conchifera (Monoplacophora, Bivalvia, Gastropoda, Cephalopoda, and Scaphopoda), forming the clade Testaria. Alternatively, the Aculifera hypothesis proposes a sister group relationship of Polyplacophora and Aplacophora, suggesting that the aplacophoran morphology was secondarily modified from a chiton-like ancestor [5,6,15,16]. Phylogenetic relationships within Conchifera are also far from settled due to the highly derived morphologies within each class-level grade, which hinder the discovery of morphological synapomorphies across lineages

* Correspondence: rafaz@mncn.csic.es

¹Department of Biodiversity and Evolutionary Biology, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Osca et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

[17]. The traditional morphology-based hypothesis groups together Bivalvia + Scaphopoda (Diasoma or Loboconcha) and Cephalopoda + Gastropoda (Cyrtosoma or Visceroconcha) [3,9].

Earlier molecular studies based on partial sequences of one or few genes revealed important phylogenetic inference biases, and failed to recover the monophyly of mollusks and/or of several main lineages within the group [18]. The first studies analyzing the relative phylogenetic position of Monoplacophora [19,20] also rendered a surprising result in recovering the group as closely related to Polyplacophora, forming the taxon Serialia, which is in disagreement with most morphological evidence [21]. More recently, attempts to reconstruct the phylogeny of mollusks were based on concatenated matrices spanning many genes. A study [22] based on 79 ribosomal protein genes recovered the monophyly of the phylum and of all five mollusk classes included in the analyses (Neomeniomorpha, Monoplacophora, and Scaphopoda were missing). However, recovered interclass relationships, although highly supported, were rather unconventional, with Bivalvia and Gastropoda being sister group to Polyplacophora, and this clade being sister group to Cephalopoda and Chaetodermomorpha [22]. The latest phylogenetic studies based on seven housekeeping genes [23], and on genomic-scale data sets spanning 308 [24] and 1185 [25] genes, respectively, recovered monophyletic Mollusca, Aplacophora, and Aculifera, thus rejecting the Testaria hypothesis. One of these studies included Monoplacophora, which was placed within Conchifera, thus providing no support for the Serialia hypothesis [25]. Interestingly, phylogenomic studies [24,25] arrived at highly supported but contrasting conchiferan interclass relationships. While both studies support a basal position of Cephalopoda (+Monoplacophora in [25]), one favors a clade composed of Gastropoda and Bivalvia (the so-called Pleistomollusca [24]) whereas the other groups together Gastropoda and Scaphopoda [25].

During the last decade, complete mitochondrial (mt) genomes have become a standard for phylogenetic reconstruction of animal relationships [26]. Although the number of completely sequenced mollusk mt genomes has increased considerably in the last few years, the majority belong to the most common and economically important mollusk classes i.e., Cephalopoda [27], Bivalvia [28], and Gastropoda [29,30]. In addition, there are reported three Polyplacophora, *Katharina tunicata* [31] and two *Sypharochiton* species [32], and two Scaphopoda, *Siphonodentalium lobatum* [33] and *Graptacme eborea* [34] mitogenomes (but note that the mt genome of a Chaetodermomorpha, *Chaetoderma nitidulum* is available at NCBI, although unpublished). The only published study [35] that has applied thus far whole mt genome data for reconstructing phylogenetic relationships of mollusks failed to recover the monophyly of Mollusca and of many mollusk classes due to long branch attraction (LBA)

artifacts. The authors concluded that representatives from all mollusks classes and a denser taxon sampling of most diverse lineages could render a more resolved mollusk interclass phylogeny, and that mt gene order data could become a promising source of phylogenetic information [35].

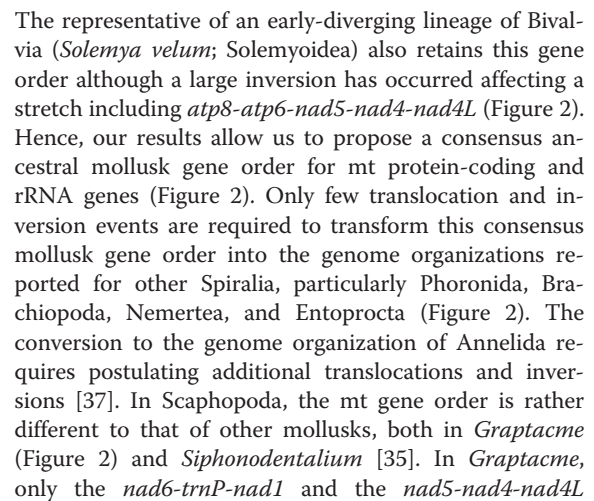
In this paper, we present the complete mitochondrial genome of *Scutopus ventrolineatus*, a representative of the supposedly early-branching Limifossoridae within Chaetodermomorpha. We performed comparative genomic analyses with other available mollusk mt genomes with the specific aim of addressing the evolution of gene order arrangements among the main lineages within the phylum. In addition, we used generated mt sequence data to infer phylogenetic relationships of mollusks, and in particular to test the validity of traditional morphology-based hypotheses that place Chaetodermomorpha at the base of the mollusk tree. Finally, we concatenated mt genomes with publicly available nuclear sequence data in trying to maximize statistical support of the reconstructed mollusk phylogeny.

Results and discussion

Mitochondrial genome organization and structural features

The complete mt genome of *Scutopus ventrolineatus* was assembled as a 14662 bp circular molecule. Like most metazoan mt genomes, it encodes for 13 protein-coding, 22 tRNA and 2 rRNA genes (Figure 1). The major strand encodes 20 out of the 37 genes (*trnE*, *nad5*, *trnH*, *nad4*, *nad4L*, *trnS*(UCN), *cob*, *nad6*, *nad1*, *trnL*(UUR), *trnL*(CUN), *rrnS*, *trnM*, *trnC*, *trnQ*, *trnY*, *rrnL*, *trnV*, *trnG*, *trnW*). Most protein-coding genes start with the codon ATG with the exception of *atp8*, which begins with GTG. Several genes show complete stop codons, either TAA (as in *cox1*, *atp8*, *atp6*, *nad4L*, *cob*, and *nad6*) or TAG (as in *cox2* and *nad1*). The remaining genes finish with either TA (*nad5*) or a single T (*cox3*, *nad2*, *nad4*), which presumably become functional stop codons by subsequent polyadenylation of the transcribed messenger RNAs [36]. Four genes overlap with contiguous genes: *cox2* with *trnD*; *atp8* with *atp6*; *nad4* with *trnH*; and *nad4L* with *nad4*. The largest noncoding region has 47 bp, and it is located between *trnW* and *trnE* genes.

The gene order arrangement of the mt genome of *S. ventrolineatus* was compared with the mt genome organization in other mollusks. The unpublished mt genome of the chaetodermomorph *C. nitidulum* is the closest to compare, but it is 40% longer (21008 bp), and shows a duplication of the *cox2* gene, as well as large non-coding regions (see Additional file 1: Figure S1). In addition, several tRNA genes (*trnV*, *trnE*, *trnG*, *trnW*, *trnA*, *trnR*, *trnI*, *trnS*(UCN)) are reordered and two (*trnV* and *trnS*(UCN)) are encoded on opposite strands when compared to the mt genome of *S. ventrolineatus*



arrangements are conserved, whereas gene pairs that are normally conserved in other metazoan mt genomes (e.g. *cox1-cox2* and *atp8-atp6*) are not found (Figure 2). New complete mt genome sequences of more (early-branching) lineages within Scaphopoda are needed in order to determine whether Scaphopoda ancestrally conformed or not to the consensus ancestral mt gene order of mollusks. Within Gastropoda and Bivalvia, highly derived mt genome organizations can be found due to extensive gene rearrangements [28,29].

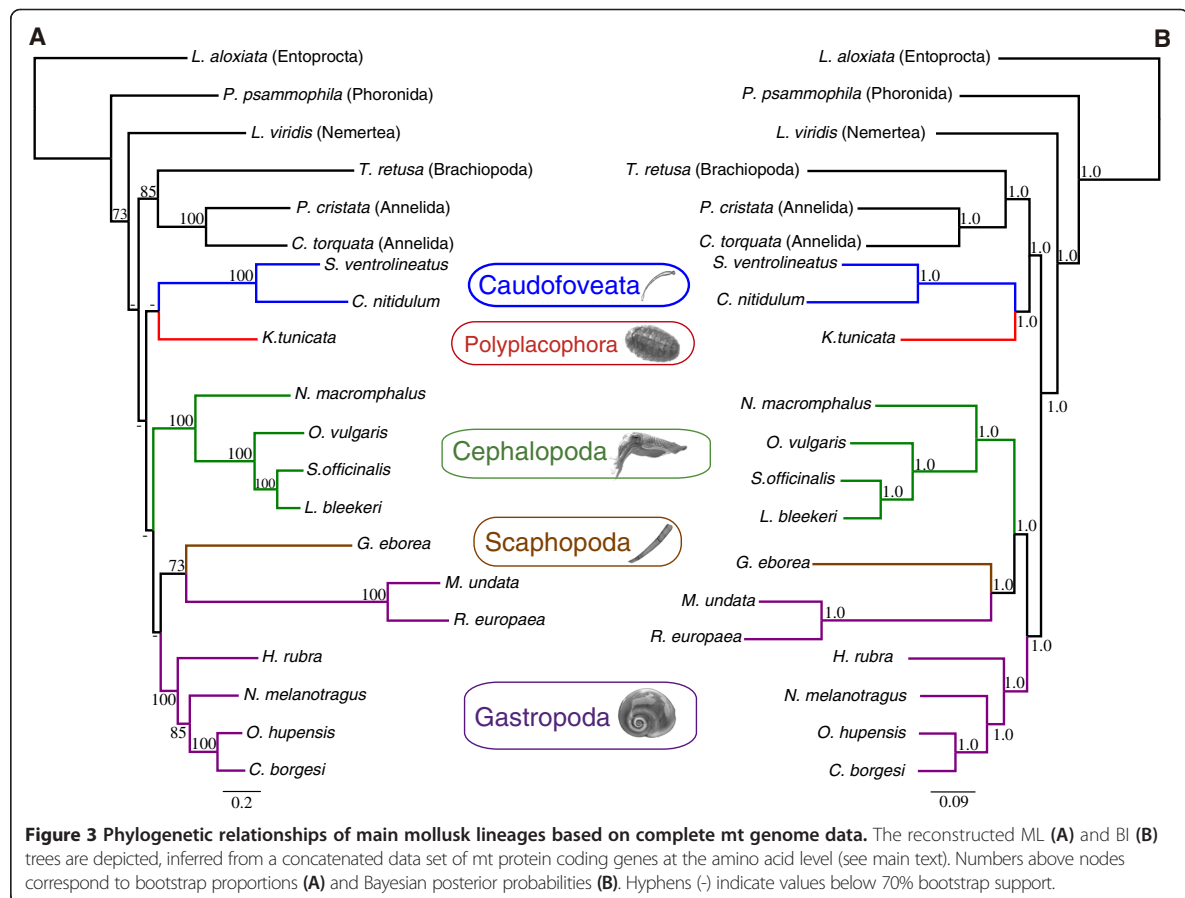
Phylogenetic relationships within Mollusca

Despite its popularity, phylogenetic inference based on complete mt genomes has important analytical challenges. In fact, reconstructing the monophyly and phylogenetic relationships of mollusks using solely mt genome data proved to be difficult. A first issue was finding the appropriate outgroup. Most recent phylogenies of spiralian place mollusks within the clade Trochozoa, which also includes annelids, nemerteans, brachiopods, and phoronids [38]. Among available mt genomes of spiralian, we selected representatives from one non-trochozoan spiralian (Entoprocta) and all trochozoan phyla. Another important problem was LBA due to among-lineage rate heterogeneity. Several ingroup lineages, notably Bivalvia, Scaphopoda, and Patellogastropoda (within Gastropoda), exhibited long branches that produced considerable inference biases (not shown), and they had to be excluded in further phylogenetic analyses. At least in several bivalves (families Donacidae, Hyriidae, Margaritiferidae, Mytilidae, Solenidae, Unionidae, and Veneridae), the occurrence of doubly uniparental inheritance (DUI) of the mt genome [39] has been proposed to cause higher substitution rates and thus faster saturation of the phylogenetic signal, hampering their use in reconstructing deep phylogenies. In addition, Neomeniomorpha and Monoplacophora could not be incorporated into the phylogenetic analyses because complete mt genomes are not available for these lineages thus far. Finally, due to the relatively high substitution rates of mtDNA, saturation is another major issue affecting the reconstruction of deep nodes based on mt markers. Here, we opted to analyze mt data at the amino acid level to reduce the effect of saturation.

The mt data set included 4870 and 2728 positions before and after sites of ambiguous positional homology were discarded. The fact that 44% of the initial length of the alignments was excluded by GBLOCKS suggests that mt genome amino acid sequence data have complex evolutionary patterns at higher levels of divergence, which would produce phylogenetic reconstruction biases if conflicting positions were not removed. ML (-lnL = 57186.85) and BI (arithmetic mean of the two runs, -lnL = 67264.29) arrived at relatively different trees (Figure 3). In ML, the monophyly of Mollusca is recovered with low bootstrap support whereas in BI, Brachiopoda + Annelida are recovered with

maximal posterior probability support as sister group of Chaetodermomorpha + Polyplacophora, rendering Mollusca non-monophyletic. Within mollusks, the clades Aculifera and Conchifera received maximal posterior probability support in BI and low (<50%) bootstrap support in the ML analysis. The phylogenetic analyses failed to recover the monophyly of gastropods due to a LBA artifact (highly supported) between *Roboastra* + *Micromelo* (Heterobranchia) and Scaphopoda, both in ML and BI. This clade is the sister group of remaining gastropods with low bootstrap support in ML or of cephalopods with maximal posterior probability support in BI (Figure 3).

Recently, two phylogenies of Mollusca have been reconstructed based on large concatenated data sets of hundreds or thousands of nuclear gene fragments [24,25]. Here, we selected nuclear genes from those matrices that minimized missing data and maximized taxon coverage to resolve the question at hand. The partial deduced amino acid sequences of 13 nuclear ribosomal protein genes (see also [22]) were aligned for 5 outgroup taxa and main mollusk lineages (19 species). The concatenation of ribosomal proteins yielded an alignment of 2362 positions after removal of ambiguous sites. Phylogenetic analyses under ML (-lnL = 33338.02) and BI (arithmetic mean of the two runs, -lnL = 36866.21) recovered similar topologies that only differed on the relative position of the neritimorph *Theodoxus* (sister group of Caenogastropoda + Heterobranchia in ML and sister group of Vetigastropoda + Patellogastropoda in BI) and on the closest sister group to mollusks (a nemertean in ML and the annelids in BI) (Figure 4). In both ML and BI, Aplacophora and Aculifera were recovered as monophyletic (as in [24,25]), although with low support (except Aculifera in BI that has a posterior probability of 0.99). In contrast, both phylogenetic analyses failed to recover the monophyly of Conchifera because Cephalopoda was placed as sister group of Aculifera (with low support in ML but with maximal Bayesian posterior probability) (Figure 4). In both ML and BI, Bivalvia was recovered as sister group of Scaphopoda + Gastropoda in agreement with [25]. Interestingly, Scaphopoda and *Lottia* showed relatively long branches, which clearly classify them as rogue taxa, showing extremely fast evolutionary rates for both mt and nuclear genes; [33,40]. The reconstructed trees based on the nuclear data set improved previous results obtained from ribosomal nuclear protein [22] and the 18S rRNA gene [40], which recovered Cephalopoda as the sister group of Chaetodermomorpha or Neomeniomorpha, respectively. However, our reconstructed trees resemble those based on housekeeping genes [23,40] that also placed Cephalopoda a sister group to Aculifera. The odd placement of Cephalopoda here and in the above-mentioned studies [22,23,40] contradicts the general agreement placing cephalopods within Conchifera [9]. This might be a tree reconstruction artifact produced by



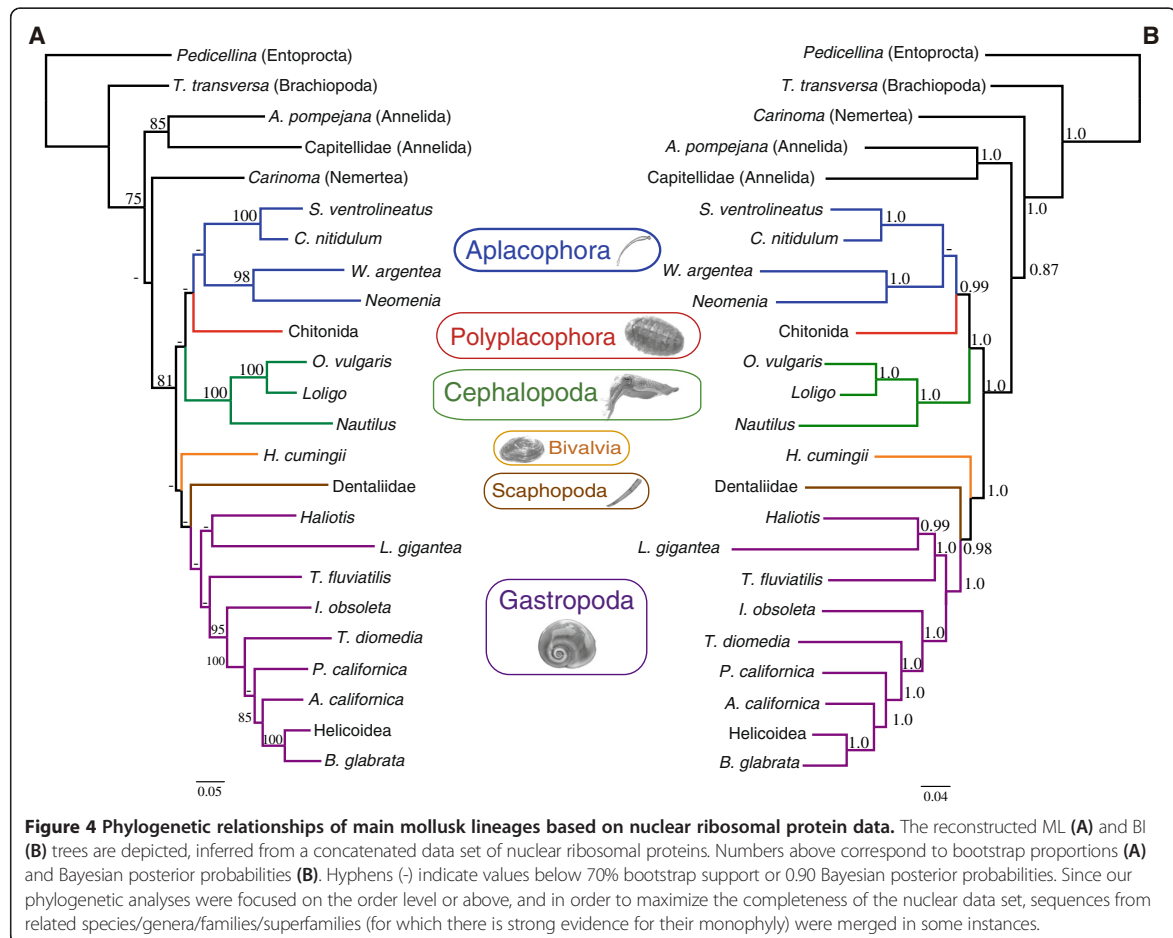
LBA biases generated by the inclusion of relatively distantly related spiralian phyla in the outgroup.

Although with a different lineage sampling and species representation, the mt and nuclear data sets rendered rather congruent trees with several nodes in common. Therefore, we concatenated the nuclear and mt data sets. The phylogenetic analyses of the combined (mt and nuclear) data set (5032 sites after removal of ambiguous positions) under ML ($-\ln L = 101714.93$) and BI (arithmetic mean of the two runs, $-\ln L = 116220.97$) arrived at very similar topologies that only differed in the relative position of Bivalvia and Scaphopoda (Figure 5). The monophyly of Aplacophora, Aculifera and Conchifera were recovered both by ML and BI (Figure 5). The corresponding nodes received relatively high support except Conchifera in ML and Aplacophora in BI (Figure 5). In ML and BI, Cephalopoda and Cephalopoda + Scaphopoda were recovered as sister group of the remaining analyzed conchiferan classes, respectively (Figure 5). In ML, Gastropoda was recovered as sister group of Bivalvia + Scaphopoda, whereas in BI Bivalvia was placed nested within Gastropoda, rendering the latter non-monophyletic

(Figure 5). These results agree with most recent phylogenomic studies [24,25] in the basal position of Cephalopoda within Conchifera, and favor either a close relationship of Gastropoda and Bivalvia to the exclusion of Scaphopoda [24] or the classical Diasoma hypothesis uniting Bivalvia and Scaphopoda [9]. It is noteworthy that the reconstructed phylogeny based on the combined data set differs from the nuclear-based tree indicating that addition of mt data has a significant (and distinct) contribution to the overall phylogenetic inference. Furthermore, previously encountered LBA artifacts when mt data was analyzed alone (related to Scaphopoda, Bivalvia and *Lottia*) were ameliorated in the combined analysis.

Conclusions

Reconstructing the monophyly and internal phylogenetic relationships of Mollusca based on molecular data has been challenging over the years. Earlier studies were mostly based on partial gene sequences with insufficient informative characters to reconstruct robust and resolved trees [18]. Recent phylogenomic studies [24,25] based on concatenated nuclear genes have produced well-resolved



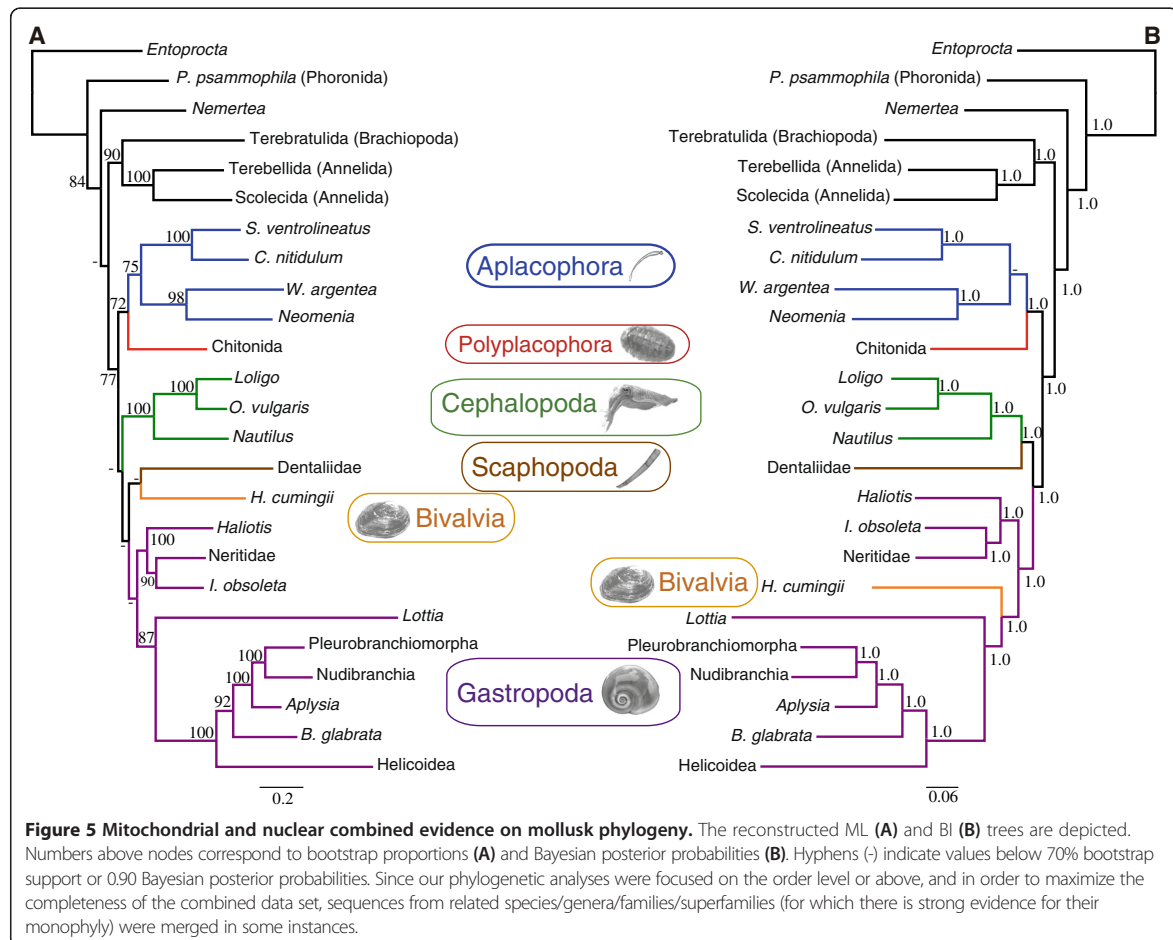
trees. However, comparison of these trees showed some contradicting but highly supported nodes. Another alternative is to investigate phylogenetic information contained in complete mt genomes. A first attempt to use whole mt genome data for clarifying the relative phylogenetic position of mollusks within bilaterians was not satisfying [35]. Our phylogenetic analyses reveal that the use of mt genome data for reconstructing the internal phylogenetic relationships of mollusks is flawed by the existence of high heterogeneity of evolutionary rates among lineages. In particular, the mt genomes of Bivalvia and *Lottia* introduce detrimental LBA biases. After removing taxa that exhibit long branches in the phylogenetic analyses, mt data are capable of recovering the monophyly of each Aculifera, and Conchifera, in agreement with nuclear data (which additionally recover the monophyly of Aplacophora). Moreover, our analyses indicate that the phylogenetic performance of mt and nuclear data improves when both are combined. At present, the complete mt genomes of several important mollusk

lineages (namely Neomeniomorpha and Monoplacophora) are still missing, and the possibility of finding mt genomes with lower substitution rates in Bilvalvia and Patellogastropoda needs to be further explored. It is foreseeable that the addition of these additional mt genomes will improve phylogenetic analyses. In parallel, gapped regions in nuclear genomic data sets will be increasingly reduced allowing in combination with mt data the reconstruction of a robust tree of Mollusca. Such a robust phylogenetic hypothesis has been long-needed as the framework for evolutionary comparative studies within this highly diversified metazoan phylum.

Methods

DNA extraction, PCR amplification, cloning and sequencing

Several specimens of *Scutopus ventrolineatus* Salvini-Plawen, 1968 (Mollusca; Chaetodermomorpha) were collected in March 2010 close to Bergen, in the Norwegian west coast. Total genomic DNA of a single specimen



was isolated following standard phenol-chloroform extraction procedures [41]. Two fragments corresponding to partial mt *cox1* *cox2* genes were PCR-amplified using appropriate universal primer pairs: LCOI 1490, HCO 2198 [42] and *cox2F1*, *cox2R1* [43], respectively. PCR reactions contained 2.5 µl of 10x Ex *Taq* Buffer, 2 µl of dNTP Mixture (2.5 mM each), 1.5 µl of each primer, 0.5 µl of template DNA, 0.16 µl Ex *Taq* Hot Start DNA polymerase (5 units/µl; TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan), and sterilized distilled water up to 25 µl. The following temperature profile was used: an initial denaturing step at 98°C for 2 min; 35 cycles of denaturing at 98°C for 10 s, annealing at 50°C for 30 s, and extending at 72°C for 1 min; and a final extending step at 72°C for 1 min. PCR products were purified by ethanol precipitation, and sequenced in an automated DNA sequencer ABI PRISM 3700 using the BigDye Terminator v3.1 cycle-sequencing kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), and PCR primers.

Newly determined partial sequences of mt *cox1* and *cox2* were used to design two pairs of specific primers for long range PCR amplification (SVCOX1.F: 5'-TTT TTG ACC CTG CTG GAG GTG GAG AC-3'; SVCOX1.R: 5'-AGA GGG GGG GAT ACA GTC CAC CCA GTC-3'; SVCOX2.F: 5'-TCC CAG CAT TGG GAG TAA AAG CCG AC-3'; SVCOX2.R: 5'-CTC CGC AGA TTT CTG AAC ATT GAC CA-3'). The full mt genome was amplified in two overlapping fragments of 13003 bp and 1771 bp, respectively, using the TaKaRa LA-PCR kit (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan). PCR amplifications were carried out in 50 µl reactions containing 5 µl of 10x LA Buffer II (Mg²⁺ plus), 8 µl of dNTP Mixture (2.5 mM each), 1 µl of each primer, 0.1 µl of template DNA and 0.5 µl Taq DNA polymerase (5 units/µl). The following temperature profile was used: an initial denaturing step at 94°C for 1 min; 45 cycles of denaturing at 98°C for 10 s, annealing at 57°C for 30 s, and extending at 68°C for 1 min per Kb; and a final

extending step at 68°C for 10 min. Sequencing of the two long PCR fragments was achieved with the shotgun technique using the TOPO-Shotgun subcloning Kit (Invitrogen; Life Technologies, Paisley, UK). Random clone libraries were constructed from purified PCR products by shearing them into fragments of 1–3 Kb in size, by repairing fragment ends to form blunt-ends, and by cloning blunt-ended fragments into pCR 4Blunt-TOPO vectors. Clones were sequenced in an automated DNA sequencer ABI PRISM 3700 using the BigDye Terminator v3.1 cycle-sequencing kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), and M13 forward and reverse universal primers.

Genome assembly and annotation

The complete mt genome was assembled into a single contig from the shotgun clone sequences using Sequencher v. 5.0.1 (Gene Codes Co.; Ann Arbor, MI, USA). The mt genome was annotated using the MITOS [44] and DOGMA [45] webserver. Briefly, protein-coding genes were annotated by identification of their open reading frames and similarity searches against other reported mollusk mt genomes. Ribosomal RNA genes were identified by sequence comparison with other reported mollusk mt genomes, and assumed to extend to the boundaries of adjacent genes. Transfer RNA genes were identified using tRNAscan-SE v. 1.21 [46] and ARWEN v. 1.2 [47], which can infer cloverleaf secondary structures of the corresponding gene products. The complete mt genome sequence reported in this paper has been deposited at NCBI GenBank under accession number KC757645.

The gene order of the mt genome of *S. ventrolineatus* was compared to the following mollusk mt genomes: *Chaetoderma nitidulum* (Chaetodermomorpha; Dreyer and Steiner, unpublished), *Katharina tunicata* (Polyplacophora; [31]), *Graptacme eborea* (Scaphopoda; [34]), *Octopus vulgaris* (Cephalopoda; [27]), *Solemya velum* (Bivalvia; [48]), and *Haliotis rubra* (Gastropoda; [49]). The following spiralian mt genomes were also included in the gene order comparisons: *Paranemertes cf. peregrina* (Nemertea; [50]), *Terebratulina retusa* (Brachiopoda; [51]), *Loxosomella aloxiata* (Entoprocta; [52]), and *Phoronis architecta* (Phoronida; [53]).

Data sets and sequence alignment

Amino acid sequences derived from the 13 mt protein-coding genes were used to assemble the mt data set, which included 14 representatives of the main extant mollusk lineages and 6 species representing several metazoan phyla other than Mollusca (see Additional file 1: Table S1). Similarly, a nuclear data set was constructed with the deduced amino acid sequences of the genes coding for 40S ribosomal proteins S8 and S15, and 60S ribosomal proteins L3,

L4, L5, L6, L7, L8, L10a, L16_L10, L17, L18a, and L32. These genes were extracted from Kocot et al. (2011) and were selected among available genes because they minimized missing data. This nuclear data set included five species representing several metazoan phyla other than Mollusca and 19 representatives of the main extant mollusk lineages (see Additional file 1: Table S2). A third data set was constructed combining the mt and nuclear data sets. The three data sets were designed to test specifically the monophyly of Mollusca and Aculifera. Since our phylogenetic analyses were focused on the order level or above, and in order to maximize the completeness of the nuclear and combined data sets, sequences from related species/genera/families/superfamilies (for which there is strong evidence for their monophyly) were merged in some instances (see Additional file 1: Table S2; [24]). Note that the original study from which nuclear data was extracted [24] already merged closely related species to maximize gene coverage. The species showing the shortest branches were selected as representatives of the different lineages in the three data sets.

Deduced amino acid sequences of the different mt and nuclear protein-coding genes were downloaded from GenBank and aligned separately using MAFFT v. 7 [54] with default settings. Ambiguously aligned positions were removed using Gblocks, v. 0.19b [55] with default settings.

Phylogenetic analyses

Alignment format conversions were performed using the ALTER webserver [56]. For the three analyzed data sets, best-fit partition schemes and models of amino acid replacement were identified using the Akaike information criterion (AIC; [57]) as implemented in PartitionFinder-Protein [58]. For the mt data set, we tested the following *a priori* partition schemes: (1) all genes combined; (2) genes by functional group (*atp*, *cox*, *nad*, *cob*); (3) all genes separately except *atp8/atp6* and *nad4L/nad4*, and (4) all genes independently. For the nuclear data set we tested (1) all genes combined, (2) by functional group (40S and 60S genes), and (3) all independent. For the combined data set, we tested all above-mentioned partition schemes. The AIC favored independent gene partitions in the nuclear and the combined data sets, whereas the best partition scheme for the mt data sets was that with all genes analyzed separately except for *atp8/atp6* and *nad4L/nad4*. The resulting best-fit models for each partition are shown in Additional file 1: Table S3.

Phylogenetic relationships were inferred using maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI). ML analyses were conducted with RAXML v. 7.0.4 [59] using the rapid hill-climbing algorithm. For BI, we used MrBayes v. 3.1.2 [60] running two independent analyses, each consisting in four simultaneous MCMC (Markov

chain Monte Carlo) for 10 million generations, sampling every 1,000 generations, and discarding the first 25% generations as burnin (as judged by plots of ML scores and low SD of split frequencies) to prevent sampling before reaching stationarity of Markov chains. Support for internal branches was evaluated by non-parametric bootstrapping [61] with 1,000 replicates (ML) and by posterior probabilities (BI).

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Comparison of mitochondrial gene orders of *Scutopus ventrolineatus* and *Chaetoderma nitidulum*. **Table S1.** Complete mitochondrial genomes used in the phylogenetic analyses. **Table S2.** Fragments of nuclear ribosomal proteins used in phylogenetic analyses. **Table S3.** Best-fit partitions and models selected by Protein Partition Finder.

Abbreviations

atp6-8: ATP synthase subunits 6-8; BI: Bayesian inference; bp: Base pairs; *cob*: Cytochrome *b*; *cox1-3*: Cytochrome *c* oxidase subunits 1-3; LBA: Long branch attraction; ML: Maximum likelihood; mt: Mitochondrial; *nad1-6*: 4 L, NADH dehydrogenase subunits 1-6, 4 L; PCR: Polymerase chain reaction; rRNA: Ribosomal RNA; *rnl*: Large ribosomal RNA; *rns*: Small ribosomal RNA; tRNA: Transfer RNA; *trnX*: Transfer RNA for amino acid X (denoted by the one-letter IUPAC symbol).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RZ conceived the study. CT conducted the sampling and identification of individuals. DO carried out laboratory work. DO, CG and II performed phylogenetic and comparative analyses. All authors contributed to the writing and improving of the manuscript, as well as read and approved the final version.

Acknowledgements

We are grateful to the late Christoffer Schander (University of Bergen, Norway) for initiating this study. We thank three anonymous reviewers for insightful comments on a previous version of the manuscript. Use of R.V. Hans Brattström for collection of specimens was granted by the Department of Biology, University of Bergen, Norway. We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URIC). DO was supported by a FPI grant (BES-2008-009562) of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). II was supported by a JAE-pre PhD Fellowship (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, and the European Social Fund, ESF) and by a Humboldt Research Fellowship for Postdoctoral Researchers (Alexander von Humboldt Foundation) during the last stage of this work. CG is currently a "Ramón y Cajal" postdoctoral fellow supported by the MINECO and the Universidad Autónoma de Madrid, Spain. The work was partly funded by projects of the MINECO to RZ (CGL2007-60954 and CGL2010-18216) and to CG (CGL2011-29916).

Author details

¹Department of Biodiversity and Evolutionary Biology, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain.

²Current address: Department of Biology, Laboratory for Zoology and Evolutionary Biology, University of Konstanz, Universitätsstr. 10, 78464 Konstanz, Germany. ³University Museum of Bergen, The Natural History Collections, University of Bergen, P.O. Box 7800, NO-5020 Bergen, Norway.

⁴Departamento de Biología Molecular and Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC - Universidad Autónoma de Madrid), Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.

Received: 15 July 2014 Accepted: 1 September 2014

Published online: 25 September 2014

References

- Ponder WF, Lindberg DR: *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. California: Univ. California Press; 2008.
- Beesley PL, Ross GJB, Wells A: *Mollusca: The Southern Synthesis*. 5th edition. Melbourne: CSIRO Publishing; 1998.
- Haszprunar G, Wanninger A: *Molluscs*. *Curr Biol* 2012, **22**(13):R510-R514.
- Hyman L: *The Invertebrates*, vol. 6 (*Mollusca I*). Boston, MA: McGraw Hill; 1967.
- Ivanov DL: **Origin of Aculifera and problems of monophyly of higher taxa in molluscs**. In *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca*. Edited by Taylor JD. Oxford: Oxford University Press; 1996:56-65.
- Scheltema A: **Aplacophora as progenetic aculiferans and the coelomate origin of mollusks as the sister taxon of Sipuncula**. *Biol Bull* 1993, **184**:57-78.
- Faller S, Rothe B, Todt C, Schmidt-Rhaesa A, Loesel R: **Comparative neuroanatomy of Caudofoveata, Solenogastres, Polyplacophora, and Scaphopoda (Mollusca) and its phylogenetic implications**. *Zoomorphology* 2012, **131**(2):149-170.
- Haszprunar G: **Is the Aplacophora monophyletic? a cladistic point of view**. *Am Malacol Bull* 2000, **15**(2):115-130.
- Haszprunar G, Schander C, Halanych KM: **Relationships of the higher molluscan taxa**. In *Towards a Phylogeny of Mollusca*. Edited by Ponder WF, Lindberg DR. Berkeley: Univ. Calif. Press; 2008:19-32.
- Salvini-Plawen L: **On the phylogenetic significance of the aplacophoran Mollusca**. *Iberus* 2003, **21**(1):67-97.
- Todt C: **Aplacophoran mollusks—still obscure and difficult?** *Am Malacol Bull* 2013, **31**(1):181-187.
- Salvini-Plawen L: **Significance of the placophora for molluscan phylogeny**. *Venus* 2006, **65**:1-17.
- Salvini-Plawen L, Steiner G: **Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca**. In *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca*. Edited by Taylor J. Oxford: Oxford University Press; 1996:29-52.
- Waller TR: **Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major groups**. In *Bivalves: An Eon of Evolution*. Edited by Johnston PA, Haggart JW. Calgary: University of Calgary Press; 1998:1-45.
- Sutton MD, Briggs DEG, Siveter DJ, Siveter DJ, Sigwart JD: **A Silurian armoured aplacophoran and implications for molluscan phylogeny**. *Nature* 2012, **490**(7418):94-97.
- Scherholz M, Redl E, Wollesen T, Todt C, Wanninger A: **Aplacophoran mollusks evolved from ancestors with polyplacophoran-like features**. *Curr Biol* 2013, **23**(21):2130-2134.
- Kocot KM: **Recent advances and unanswered questions in deep molluscan phylogenetics**. *Am Malacol Bull* 2013, **31**(1):195-208.
- Passamanek YJ, Schander C, Halanych KM: **Investigation of molluscan phylogeny using large-subunit and small-subunit nuclear rRNA sequences**. *Mol Phylogenet Evol* 2004, **32**(1):25-38.
- Wilson N, Rouse G, Giribet G: **Assessing the molluscan hypothesis Serialia (Monoplacophora + Polyplacophora) using novel molecular data**. *Mol Phylogenet Evol* 2010, **54**(1):187-193.
- Giribet G, Okusu A, Lindgren A, Huff S, Schrod M, Nishiguchi M: **Evidence for a clade composed of molluscs with serially repeated structures: Monoplacophorans are related to chitons**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(20):7723-7728.
- Wägele J, Letsch H, Klussmann-Kolb A, Mayer C, Misof B, Wägele H: **Phylogenetic support values are not necessarily informative: the case of the Serialia hypothesis (a mollusk phylogeny)**. *Front Zool* 2009, **6**(1):1-15.
- Meyer A, Witek A, Lieb B: **Selecting ribosomal protein genes for invertebrate phylogenetic inferences: how many genes to resolve the Mollusca?** *Methods Ecol Evol* 2011, **2**(1):34-42.
- Vinther J, Sperling EA, Briggs DEG, Peterson KJ: **A molecular palaeobiological hypothesis for the origin of aplacophoran molluscs and their derivation from chiton-like ancestors**. *Proc Roy Soc B Biol Sci* 2012, **279**(1732):1259-1268.
- Kocot KM, Cannon JT, Todt C, Citarella MR, Kohn AB, Meyer A, Santos SR, Schander C, Moroz LL, Lieb B, Halanych KM: **Phylogenomics reveals deep molluscan relationships**. *Nature* 2011, **477**(7365):452-456.
- Smith SA, Wilson NG, Goetz FE, Feehery C, Andrade SCS, Rouse GW, Giribet G, Dunn CW: **Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools**. *Nature* 2011, **480**(7377):364-367.

26. Bernt M, Bleidorn C, Braband A, Dambach J, Donath A, Fritsch G, Golombek A, Hadrys H, Jühling F, Meusemann K, Middendorf M, Misof B, Perseke M, Podsiadlowski L, von Reumont B, Schierwater B, Schlegel M, Schrödl M, Simon S, Stadler PF, Stöger I, Struck TH: **A comprehensive analysis of bilaterian mitochondrial genomes and phylogeny.** *Mol Phylogenet Evol* 2013, **69**(2):352–364.
27. Si Y, Fukuda N, Nakamura M, Aoyama T, Oshima T: **Long-term conservation of six duplicated structural genes in cephalopod mitochondrial genomes.** *Mol Biol Evol* 2004, **21**(11):2034–2046.
28. Yuan Y, Li Q, Yu H, Kong L: **The complete mitochondrial genomes of six heterodont bivalves (Tellinoidea and Solenoidea): variable gene arrangements and phylogenetic implications.** *PLoS One* 2012, **7**(2):e32353.
29. Cunha R, Grande C, Zardoya R: **Neogastropod phylogenetic relationships based on entire mitochondrial genomes.** *BMC Evol Biol* 2009, **9**(1):210.
30. Medina M, Lai S, Vallés Y, Takaoka TL, Dayrat BA, Boore JL, Gosliner T: **Crawling through time: transition of snails to slugs dating back to the Paleozoic, based on mitochondrial phylogenomics.** *Mar Genom* 2011, **4**(1):51–59.
31. Boore J, Brown W: **Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the black chiton, *Katharina tunicata*.** *Genetics* 1994, **138**:423–443.
32. Veale AJ, Williams L, Tsai P, Thakur V, Lavery S: **The complete mitochondrial genomes of two chiton species (*Sypharochiton pelliserpentis* and *Sypharochiton sinclairi*) obtained using Illumina next generation sequencing.** In *Mitochondrial DNA*. 2014. doi:10.3109/19401736.2014.905846.
33. Dreyer H, Steiner G: **The complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the gadilid scaphopod *Siphonodontalium lobatum* (Mollusca).** *Mol Phylogenet Evol* 2004, **31**:605–617.
34. Boore JL, Medina M, Rosenberg LA: **Complete sequences of the highly rearranged molluscan mitochondrial genomes of the scaphopod *Graptacme eborea* and the bivalve *Mytilus edulis*.** *Mol Biol Evol* 2004, **21**(8):1492–1503.
35. Stöger I, Schrödl M: **Mitogenomics does not resolve deep molluscan relationships (yet?).** *Mol Phylogenet Evol* 2013, **69**(2):376–392.
36. Ojala D, Montoya J, Attardi G: **tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria.** *Nature* 1981, **290**(5806):470–474.
37. Mwinyi A, Meyer A, Bleidorn C, Lieb B, Bartolomaeus T, Podsiadlowski L: **Mitochondrial genome sequence and gene order of *Sipunculus nudus* give additional support for an inclusion of Sipuncula into Annelida.** *BMC Genomics* 2009, **10**(1):27.
38. Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD, Sørensen MV, Haddock SHD, Schmidt-Rhaesa A, Okusu A, Kristensen RM, Wheeler WC, Martindale MQ, Giribet G: **Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life.** *Nature* 2008, **452**(7188):745–749.
39. Breton S, Beaupré HD, Stewart DT, Hoeh WR, Blier PU: **The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough?** *Trends Genet* 2007, **23**(9):465–474.
40. Meyer A, Todt C, Mikkelsen N, Lieb B: **Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity.** *BMC Evol Biol* 2010, **10**(1):70.
41. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Volume 1, 2, 3.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
42. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz RA, Vrijenhoek RC: **DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.** *Biotech: Mol Mar Biol* 1994:3.
43. Burger G, Lavrov D, Forget L, Lang B: **Sequencing complete mitochondrial and plastid genomes.** *Nat Protoc* 2007, **2**:603–614.
44. Bernt M, Donath A, Jühling F, Externbrink F, Florentz C, Fritsch G, Pütz J, Middendorf M, Stadler PF: **MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation.** *Mol Phylogenet Evol* 2013, **69**(2):313–319.
45. Wyman S, Jansen R, Boore J: **Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA.** *Bioinformatics* 2004, **20**(17):3252–3255.
46. Schattner P, Brooks A, Lowe T: **The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(suppl 2):W686–W689.
47. Laslett D, Canback B: **ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences.** *Bioinformatics* 2008, **24**(2):172–175.
48. Plazzi F, Ribani A, Passamonti M: **The complete mitochondrial genome of *Solemya velum* (Mollusca: Bivalvia) and its relationships with Conchifera.** *BMC Genomics* 2013, **14**(1):409.
49. Maynard B, Kerr L, McKiernan J, Jansen E, Hanna P: **Mitochondrial DNA sequence and gene organization in Australian backpack abalone *Haliotis rubra* (leach).** *Mar Biotechnol (NY)* 2005, **7**:645–658.
50. Chen H-X, Sundberg P, Wu H-Y, Sun S-C: **The mitochondrial genomes of two nemerteans, *Cephalothrix* sp. (Nemertea: Palaeonemertea) and *Paranemertes* cf. *peregrina* (Nemertea: Hoplonemertea).** *Mol Biol Rep* 2011, **38**(7):4509–4525.
51. Stechmann A, Schlegel M: **Analysis of the complete mitochondrial DNA sequence of the brachiopod *Terebratulina retusa* places Brachiopoda within the protostomes.** *Proc Roy Soc Lond B Biol Sci* 1999, **266**(1433):2043–2052.
52. Si Y, Iseto T, Asakawa S, Sasaki T, Shimizu N, Yamagishi A, Oshima T, Hirose E: **Complete nucleotide sequences of mitochondrial genomes of two solitary entoprocts, *Loxocorone allax* and *Loxosomella aloxiata*: implications for lophotrochozoan phylogeny.** *Mol Phylogenet Evol* 2008, **47**(2):612–628.
53. Helfenbein KG, Boore JL: **The mitochondrial genome of *Phoronis architecta*—comparisons demonstrate that phoronids are lophotrochozoan protostomes.** *Mol Biol Evol* 2004, **21**(1):153–157.
54. Katoh K, Standley DM: **MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability.** *Mol Biol Evol* 2013, **30**(4):772–780.
55. Castresana J: **Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis.** *Mol Biol Evol* 2000, **17**(4):540–552.
56. Glez-Peña D, Gómez-Blanco D, Reboiro-Jato M, Fdez-Riverola F, Posada D: **ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(suppl 2):W14–W18.
57. Akaike H: **Information theory and an extension of the maximum likelihood principle.** In *2nd International Symposium on Information Theory*. Edited by Petrov BN, Csaki F. Budapest, Hungary: Akademiai Kiado; 1973:267–281.
58. Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S: **PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses.** *Mol Biol Evol* 2012, **29**(6):1695–1701.
59. Stamatakis A: **RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models.** *Bioinformatics* 2006, **22**(21):2688–2690.
60. Ronquist F, Huelsenbeck JP: **MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.** *Bioinformatics* 2003, **19**(12):1572–1574.
61. Felsenstein J: **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.** *Evolution* 1985, **39**:783–791.

doi:10.1186/s12862-014-0197-9

Cite this article as: Osca et al.: The complete mitochondrial genome of *Scutopus ventrolineatus* (Mollusca: Chaetodermomorpha) supports the Aculifera hypothesis. *BMC Evolutionary Biology* 2014 **14**:197.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3.2 PUBLICACIÓN 2: THE MITOCHONDRIAL GENOME OF *IFREMERIA NAUTILEI* AND THE PHYLOGENETIC POSITION OF THE ENIGMATIC DEEP-SEA ABYSOCHRYSOIDEA (MOLLUSCA: GASTROPODA)

Título: "The mitochondrial genome of *Ifremeria nautilei* and the phylogenetic position of the enigmatic deep-sea Abyssochrysoidea (Mollusca: Gastropoda)"

Autores: David Osca, José Templado, Rafael Zardoya

Estado: Publicado

Año: 2014

Revista: Gene, 547 (2):257-266

Resumen:

Se presenta la secuencia nucleotídica completa del genoma mitocondrial del caracol de las fumarolas submarinas *Ifremeria nautilei* (Gastropoda: Abyssochrysoidea). La molécula de doble cadena tiene una longitud de 15664 pb y codifica para los 37 genes mitocondriales típicos de los metazoos.

El ordenamiento génico de esta especie es prácticamente idéntico al de los genomas de Caenogastropoda y difiere, tan solo, en la posición relativa del trna-W. Las secuencias traducidas a aminoácidos de los genes codificantes fueron alineadas con secuencias ortólogas de gasterópodos representantes de los principales linajes y sus relaciones filogenéticas fueron inferidas. La filogenia resultante apoya la pertenencia de *Ifremeria* a los Caenogastropoda y su relación cercana a las superfamilias de Hypsogastropoda. Los resultados fueron comparados con los obtenidos en un análisis molecular solo con genes nucleares. Por otra parte, se realizó un árbol filogenético con reloj molecular partiendo de datos del registro fósil, obteniéndose como resultado que el periodo de divergencia de los Abyssochrysoidea data del Jurásico Superior-Cretácico Inferior, lo que indica una colonización

relativamente moderna de los ambientes quimioautótrofos del océano profundo por parte de estos gasterópodos.



Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene



The mitochondrial genome of *Ifremeria nautilei* and the phylogenetic position of the enigmatic deep-sea Abysochrysoidea (Mollusca: Gastropoda)

David Osca, José Templado, Rafael Zardoya *

Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC), José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 May 2014
Received in revised form 17 June 2014
Accepted 20 June 2014
Available online 23 June 2014

Keywords:

Caenogastropod
Deep-sea vent fauna
Abysochrysoidea
mtDNA

ABSTRACT

The complete nucleotide sequence of the mitochondrial (mt) genome of the deep-sea vent snail *Ifremeria nautilei* (Gastropoda: Abysochrysoidea) was determined. The double stranded circular molecule is 15,664 pb in length and encodes for the typical 37 metazoan mitochondrial genes. The gene arrangement of the *Ifremeria* mt genome is most similar to genome organization of caenogastropods and differs only on the relative position of the *trnW* gene. The deduced amino acid sequences of the mt protein coding genes of *Ifremeria* mt genome were aligned with orthologous sequences from representatives of the main lineages of gastropods and phylogenetic relationships were inferred. The reconstructed phylogeny supports that *Ifremeria* belongs to Caenogastropoda and that it is closely related to hypsochrysoidean superfamilies. Results were compared with a reconstructed nuclear-based phylogeny. Moreover, a relaxed molecular-clock timetree calibrated with fossils dated the divergence of Abysochrysoidea in the Late Jurassic–Early Cretaceous indicating a relatively modern colonization of deep-sea environments by these snails.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Totally independent from sunlight, deep-sea hydrothermal vent and cold seep ecosystems are based on chemoautotrophic bacteria, which either have symbiotic relationships with or are the food source of complex metazoan communities mainly dominated by vestimentiferan tubeworms (siboglinid polychaetes), vesicomyid and bathymodiolid mussels, provannid snails, and bresiliid shrimps (Little and Vrijenhoek, 2003; Van Dover, 2000; Van Dover et al., 2002).

Several authors (McArthur and Tunncliffe, 1998; Newman, 1985; Tunncliffe, 1992) advocated for ancient (Paleozoic) origins of deep-sea hydrothermal vent and cold seep macrofauna based on the morphology of extant taxa inhabiting these ecosystems, the observed high levels of endemic and relict species, and the potential role of hydrothermal vents and cold seeps as refugia during mass extinctions thanks to their energy autonomy. Although it is true that living deep-sea fauna have significantly longer geologic ranges than other marine fauna (Kiel and Little, 2006), the rich fossil record of e.g. vent and seep

mollusks goes back to the Late Jurassic–Early Cretaceous, suggesting relatively modern (Late Mesozoic or even Cenozoic) origins from non-vent ancestors (Jacobs and Lindberg, 1998; Kiel and Little, 2006; Little and Vrijenhoek, 2003; Warén and Bouchet, 2001). Moreover, early molecular studies also supported relatively younger origin, although they are based on relatively short sequences and poorly resolved phylogenies that used calibrated strict molecular clocks (Little and Vrijenhoek, 2003; McArthur and Koop, 1999; Peek et al., 1997; Shank et al., 1999). In order to discriminate among competing hypotheses, it would be important to reconstruct robust phylogenies based on multi-gene data sets, to use relaxed-molecular clocks (Yang et al., 2013), and to select groups with a rich fossil record (Little and Vrijenhoek, 2003).

Snails of the superfamily Abysochrysoidea (Gastropoda: Caenogastropoda) commonly occur in deep-sea environments including hydrothermal vents, hydrocarbon seeps, and sites of organic deposition such as sunken wood and whale-falls (Johnson et al., 2010). These gastropods represent a relatively ancient lineage that has persisted since at least the Middle–Late Jurassic (Kaim et al., 2008; Kiel, 2010; Kiel et al., 2008). Therefore, this group of enigmatic gastropods constitutes a nice model system to test alternative hypotheses on the origin of the deep-sea hydrothermal vent and cold seep fauna. The superfamily Abysochrysoidea, as currently constructed (Sasaki et al., 2010) includes two extant families: Abysochrysoidea, with the only extant genus *Abysochrysoidea* and the extinct genus *Humtulpisia* (Kiel, 2008), and Provannidae, which includes the extant genera *Ifremeria*, *Provanna*, *Alviniconcha*, *Cordesia* and *Desbruyeresia* (Sasaki et al., 2010) and the

Abbreviations: Mt, mitochondrial; Atp, mitochondrial ATPase; BI, Bayesian inference; Bp, base pairs; Cob, mitochondrial cytochrome b; Cox, mitochondrial cytochrome oxidase; LBA, Long branch attraction; ML, maximum likelihood; MYA, million years ago; Nad, mitochondrial NADH dehydrogenase; PCR, Polymerase Chain Reaction; trn, tRNA gene; tRNA, transfer RNA.

* Corresponding author.

E-mail addresses: davidosca@mncn.csic.es (D. Osca), templado@mncn.csic.es (J. Templado), rafaz@mncn.csic.es (R. Zardoya).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.040>
0378-1119/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Late Pliocene fossil genus *Kaneconcha* (Kaim et al., 2012). Furthermore, the extinct family Hokkaidoconchidae (Kaim et al., 2008) has been also included in this superfamily, as well as the enigmatic extant genus *Rubyspira*, discovered from whale falls (Johnson et al., 2010). Phylogenetic relationships within the superfamily were reconstructed by (Johnson et al., 2010) based on a multi-gene data set, suggesting the paraphyly of Provannidae. In this study, a relaxed molecular clock dated the origin of Abysochrysoidea in the Early Cretaceous and lineage split into three major clades (*Provanna*; *Rubyspira*, *Abysochrysos*, and *Desbruyeresia*; *Alviniconcha* and *Ifremeria*) during the Mid Cretaceous (Johnson et al., 2010). *Ifremeria* and *Alviniconcha* are known exclusively from hydrothermal vents and they are the only known members of this superfamily to host chemosymbiotic bacteria in their gills (Kaim et al., 2012).

As regards to its relative phylogenetic position within Gastropoda, the Abysochrysoidea were initially considered by Warén and Ponder (1991) and Warén and Bouchet (2001) as relict members of the otherwise extinct Loxonematoidea, as suggested previously by Houbrick (1979). Later, Bouchet and Rocroi (2005) placed them within the “Zygopleuroid group” of uncertain systematic position within the Caenogastropoda. On the other hand, phylogenetic analysis by Ponder and Lindberg (1997) and Ponder et al. (2008; see Fig. 13.16) based on morphological characters placed Provannidae as a sister group of Littorinidae and closely related to Eatoniellidae and Cingulopsidae. Likewise, phylogenetic studies based on mitochondrial 16S rRNA gene also placed tentatively Provannidae as a sister group of Littorinidae (Colgan et al., 2007). Moreover, sperm ultrastructure suggested affinities between these two families (Healy, 1990). Nevertheless, the systematic position of Abysochrysoidea remains unclear and requires clarification with further genetic studies providing robust support.

Here, we report the complete nucleotide sequence of the mitochondrial (mt) genome of *Ifremeria nautili*, the only known species of the genus. This large-sized snail is one of the dominant gastropods of the hydrothermal vent fields of the south-west Pacific, and is becoming a model system of Abysochrysoidea for population genetic and phylogeographic studies (Hidaka et al., 2012; Kojima et al., 2000; Suzuki et al., 2006; Thaler et al., 2011). The new mt genome sequence data of *I. nautili* were combined with corresponding available data from other Caenogastropoda in order to elucidate its relative phylogenetic position. In addition, we investigated the evolution of mt genome rearrangements within Caenogastropoda, including the reported translocation of the *trnW* gene in the mt genome of *I. nautili* (shared with *Alviniconcha*) with respect to *Provanna*, *Abysochrysos* and *Desbruyeresia* (Hidaka et al., 2012). Finally, we used a timetree of gastropods that was calibrated based on fossil data to test between competing hypotheses on the origin of Abysochrysoidea.

2. Materials and methods

2.1. DNA extraction, PCR amplification and sequencing

A specimen of *I. nautili* collected by Hans Tøre Rapp (University of Bergen, Norway) in Lau Basin (Pacific Ocean) in 2009 was used for this study. The voucher is stored at the tissue/DNA collection of the National Museum of Natural Sciences in Madrid (Spain) with No. MNCN/ADN 59262.

Total genomic DNA was isolated following a standard phenol–chloroform extraction. Two sets of specific PCR primer pairs were designed for long PCR: (1) IN16S.F (5′-CCGCGGTACTCTGACCGTCAAAGG-3′) and IN16S.R (5′-AGAAGCTCTGAATGTTCTCAGTCGCCCA-3′), which were derived from the *rnl* sequence available at GenBank accession No. GQ290492.1 (Johnson et al., 2010); and (2) primers INCOX3.F (5′-AGGTTCTGTGGCCCCCTTCTGGA-3′) and INCOX3.R (5′-GCAAAAAGCCCTTGAATAGCTCTCTCCGA-3′), which were designed upon the sequencing of a DNA fragment that was PCR amplified using universal *cox3* primers (Boore and Brown, 2000). These two sets of primers

allowed the amplification of the remaining mtDNA in two overlapping fragments (7725 bp and 7938 bp, respectively) using the TaKaRa LA-PCR kit. Long PCR amplifications were carried out in 50 µl reactions containing 5 µl of 10× LA Buffer II (Mg²⁺ plus), 8 µl of dNTP mixture (2.5 mM each), 1 µl of each primer, 0.5 µl of template DNA and 0.5 µl Taq DNA polymerase (5 units/µl) and adding sterilized distilled water up to 50 µl. The following profile was used: an initial denaturing step at 98 °C for 30 s; 45 cycles of denaturing at 98 °C for 10 s, annealing at 57 °C for 30 s, and extension at 68 °C for 60 s per kb; and a final extension step at 68 °C for 10 min. Long-PCR products were purified by ethanol precipitation and the two overlapping fragments were pooled together in equimolar concentrations for massive parallel sequencing. An indexed DNA library (with inserts of 200–500 bp) was constructed using the TruSeq DNA Sample Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) and following manufacturer's instructions at the Sequencing Service of the Biomedicine and Biotechnology Institute of Cantabria (IBBTec; Santander, Spain). The *Ifremeria* indexed library was pooled together with several indexed libraries from other mt genome and transcriptome projects into a single Illumina lane (HiSeq2000) and sequenced using the 100 bp pair-ended technique at Macrogen (Seoul, Korea). The complete mt genome sequence reported in this paper has been deposited in NCBI GenBank under accession number KC757644.

2.2. Genome assembly and annotation

Raw reads from each of the projects run in the single Illumina lane were pulled apart by their unique indexes used in library construction. Prior to assembly, the quality of the raw Illumina reads was checked with FastQC v.0.10.1 (Andrews, 2010); all adapter sequences were removed with SeqPrep v1.1 (St John, 2011) and reads were trimmed and filtered out according to their quality scores using PRINSEQ v.0.20.3 (Schmieder and Edwards, 2011). The CLC Genomics Workbench® v.5.5.1 (<http://www.clcbio.com>; CLC bio, Aarhus, Denmark) was used for the de novo assembly of the mt genome. The probabilistic variant calling method implemented in CLC Genomics Workbench was used to check and correct possible disagreements among reads that mapped onto the mt genome sequences. Most (90%) of the mtDNA was assembled directly from the HiSeq (short-read) data. However, a fragment between *trnG* and *rnl* genes had low coverage statistics in the assembly and was PCR amplified independently using primers IN_tGly.F, 5′-TCTGCTTGAAGGCAACTGTAC-3′ and IN16S.R (see above). The amplified PCR fragment was Sanger sequenced to close the circular mt genome using the PCR primers and a walking primer, IN12S.F, 5′-TGACGTCAGATCAAGGTGCAACCA-3′.

The 13 mt protein-coding genes were annotated by identifying their open reading frames and by comparing them with other reported mollusk mt genomes using the MITOS (Bernt et al., 2013) and DOGMA (Wyman et al., 2004) web servers. The transfer RNA (tRNA) genes were further identified with tRNAscan-SE 1.21 (Schattner et al., 2005) and ARWEN 1.2 (Laslett and Canbäck, 2008), which infer cloverleaf secondary structures. The ribosomal RNA (rRNA) genes were identified by sequence comparison with other reported mollusk mt genomes, and assumed to extend to the boundaries of adjacent genes (Boore et al., 2005).

The gene order of the mt genome of *I. nautili* was compared to the gene arrangement of other reported mollusk mitochondrial genomes (Table 1): one cephalopod, *Octopus vulgaris* (Yokobori et al., 2004), and 14 gastropods: one Vetigastropoda: *Haliotis rubra* (Maynard et al., 2005), one Neritimorpha: *Nerita melanotragus* (Castro and Colgan, 2010), one Patellogastropoda: *Lottia digitalis* (Simison et al., 2006), six Heterobranchia: *Roboastra europaea* (Grande et al., 2002), *Pyramidella dolabrata* and *Onchidella celtica* (Grande et al., 2008), *Albinaria caerulea* (Hatzoglou et al., 1995), *Aplysia californica* (Knudsen et al., 2006), *Pupa strigosa* (Kurabayashi and Ueshima, 2000) and five Caenogastropoda: *Oncomelania hupensis* (Zhao et al., 2010), *Dendropoma maximum*

Table 1
Mitochondrial genome and nuclear gene sequences analyzed in this study.

Species	GenBank ID MitoGenome	Taxa	Nuclear gene fragments				GenBank ID
			18S	28S D1	28S D6	H3	
<i>Octopus vulgaris</i>	NC_006353	Cephalopoda	<i>Granelledone verrucosa</i>	<i>Octopus cyanea</i>	<i>Granelledone pacifica</i>	<i>Octopus joubini</i>	AY557468; AJ310244; AY145407; AY377781
<i>Nerita melanotragus</i>	GU810158 ^a	Neritimorpha	<i>Nerita atramentosa</i>	<i>Nerita atramentosa</i>	<i>Nerita atramentosa</i>	<i>Nerita atramentosa</i>	DQ916542; AY296885; DQ916495; AF033701
<i>Haliotis rubra</i>	NC_005940	Vetigastropoda	<i>Haliotis corrugata</i>	<i>Haliotis corrugata</i>	<i>Haliotis corrugata</i>	<i>Haliotis corrugata</i>	FJ977644; FJ977675; FJ977675; FJ977736
<i>Dendropoma maximum</i>	NC_014583	Vermetoidea	<i>Serpulorbis imbricatus</i>	<i>Serpulorbis</i> sp.	<i>Serpulorbis</i> sp.	<i>Serpulorbis</i> sp.	HQ833992; AY296899; DQ916475; AF033710
<i>Ifremeria nautilei</i>	KC757644	Abyssochrysoidea	<i>Ifremeria nautilei</i>	<i>Ifremeria nautilei</i>	<i>Ifremeria nautilei</i>	<i>Ifremeria nautilei</i>	GQ290545; GQ290527; GQ290564; GQ290631
<i>Oncomelania hupensis</i>	NC_013073	Rissooidea	<i>Rissoina fasciata</i>	<i>Rissoina fasciata</i>	<i>Rissoina fasciata</i>	<i>Pisinnia albizona</i>	DQ916528; DQ916576; DQ916474; DQ916448
<i>Cymatium parthenopeum</i>	NC_013247	Tonnoidea	<i>Tonna cerevesima</i>	<i>Tonna cerevesima</i>	<i>Tonna cerevesima</i>	<i>Tonna cerevesima</i>	DQ916534; DQ916582; DQ916483; DQ916453
<i>Bolinus brandaris</i>	NC_013250	Muricoidea	<i>Dicathais orbita</i>	<i>Dicathais orbita</i>	<i>Dicathais orbita</i>	<i>Dicathais orbita</i>	DQ916537; AY296898; DQ916487; AF033690
<i>Conus borgesii</i>	NC_013243	Conoidea	<i>Conus miles</i>	<i>Conus miles</i>	<i>Conus miles</i>	<i>Conus miles</i>	DQ916538; AY296900; DQ916490; AF033684
<i>Onchidella celtica</i>	NC_012376	Systellommatophora	<i>Onchidella floriana</i>	<i>Onchidium verruculatum</i>	<i>Onchidium verruculatum</i>	<i>Onchidium</i> sp.	AY427522; AY427487; DQ256742; AF033706
<i>Albinaria caerulea</i>	NC_001761	Stylommatophora	<i>Arion silvaticus</i>	<i>Arion silvaticus</i>	<i>Arion silvaticus</i>	<i>Albinaria puella</i>	AY145365; AY145392; AY145392; JX098162
<i>Pyramidella dolabrata</i>	NC_012435	Pyramidelloidea	<i>Boonea seminuda</i>	<i>Boonea seminuda</i>	<i>Boonea seminuda</i>	<i>Turbonilla lactea</i>	AY145367; AY145395; AY145395; EF133488
<i>Aplysia californica</i>	NC_005827	Aplysioidea	<i>Aplysia juliana</i>	<i>Aplysia juliana</i>	<i>Aplysia juliana</i>	<i>Aplysia juliana</i>	DQ916539; AY296905; U78644; AF033675
<i>Roboastra europaea</i>	NC_004321	Nudibranchia	<i>Dialula</i> sp.	<i>Hypselodoris infucata</i>	<i>Dialula sandigensis</i>	<i>Roboastra ricei</i>	AY145374; FJ917467; AY144352; HM162504
<i>Pupa strigosa</i>	NC_002176	Acteonoidea	<i>Pupa solidula</i>	<i>Pupa solidula</i>	<i>Rictaxis punctocaelatus</i>	<i>Pupa solidula</i>	AY427516; AY427481; FJ917243; EF133483
<i>Lottia digitalis</i>	NC_007782	Patellogastropoda	<i>Lottia gigantea</i>	<i>Lottia gigantea</i>	<i>Lottia gigantea</i>	<i>Lottia gigantea</i>	FJ977632; FJ977662; FJ977662; FJ977725

^a Almost complete.

(Rawlings et al., 2010) and *Cymatium parthenopeum*, *Bolinus brandaris* and *Conus borgesii* (Cunha et al., 2009).

2.3. Sequence alignment

The mtDNA sequence of *I. nautilei* was aligned to the orthologous sequences of 14 complete mt genomes of representatives of main gastropod orders and one cephalopod (Table 1). Derived amino acid sequences corresponding to all 13 mt protein-coding genes were downloaded from GenBank using MitoBank (Abascal et al., 2007). Due to the relatively high substitution rates of mtDNA, phylogenetic analyses were conducted based on the concatenation of the deduced amino acid sequences of the 13 protein-coding genes (hereafter the mt data set) in order to ameliorate saturation.

In addition, a nuclear data set was constructed by retrieving from GenBank the nucleotide sequences of the nuclear genes 18S, 28S (domains d1 and d6), and histone H3 (Johnson et al., 2010) of the representatives of the main orders of gastropods and one cephalopod (Table 1). In order to minimize missing data, in some cases we had to concatenate sequences from species for which there is strong evidence for the monophyly of the higher taxon rank (Table 1). Finally, we concatenated mt and nuclear sequence data into a single data set, hereafter named the combined data set.

In order to construct the different data sets, deduced amino acid sequences of the 13 protein-coding genes (mt data set) or the nucleotide sequences of the three analyzed genes (nuclear data set) were aligned separately using MAFFT (Katoh et al., 2002) with default settings. Ambiguously aligned positions were removed using Gblocks, v.0.19b (Castresana, 2000) under default settings. Finally, the different single alignments were concatenated.

2.4. Phylogenetic analyses

Phylogenetic relationships were inferred using maximum likelihood (ML; Felsenstein, 1981) and Bayesian inference (BI; Huelsenbeck and Ronquist, 2001). ML analyses were conducted with RAxML v7.0.4 (Stamatakis, 2006) using the rapid hill-climbing algorithm. BI analyses were conducted using MrBayes v3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) and running four simultaneous Markov chains for 10 million generations, sampling every 1000 generations, and discarding the first 25% generations as burn-in (as judged by plots of ML scores and low SD of split frequencies) to prevent sampling before reaching stationarity. Two independent Bayesian inference runs were performed to increase the chance of adequate mixing of the Markov chains and to increase the chance of detecting failure to converge.

The best partition schemes and best-fit models of substitution for the three data sets were identified using Partition Finder and Partition Finder Protein (Lanfear et al., 2012) with the Akaike information criterion. For the mt data set the partitions tested were: all genes combined; all genes separated; all genes separated except *nad4/nad4L* and *atp8/atp6*; genes grouped by subunits i.e., *cox*, *atp*, *nad* and *cob*. For the nuclear data set the two partitions tested were: all genes combined versus all genes separated. The results of Partition Finder are shown in Appendix. Support for internal branches was evaluated by non-parametric bootstrapping (Felsenstein, 1985) with 1000 replicates (ML) and by posterior probabilities (BI).

2.5. Estimation of divergence times

We used BEAST v.1.7 (Drummond and Rambaut, 2007) to perform a Bayesian estimation of divergence times among major gastropod

lineages based on the mt amino acid data set. This software was used to infer tree topology, branch lengths, and nodal ages. For the clock model, we selected the lognormal relaxed-clock model, which allows rates to vary among branches without any a priori assumption of autocorrelation between adjacent branches. For the tree prior, we employed a Yule process of speciation. The ingroup was considered monophyletic with respect to the outgroup (*O. vulgaris*). We employed the partitions selected by Partition Finder Protein (see above), and the mtREV model for all partitions as selected by PROTTEST (Abascal et al., 2005) among the ones available in BEAST. The final Markov chain was run twice for 50 million generations, sampling every 1000 generations and the first 5 million was discarded as part of the burn-in process, according to the convergence of chains checked with Tracer v.1.5. (Rambaut and Drummond, 2007). The effective sample size of all the parameters was above 200.

The posterior distribution of the estimated divergence times was obtained by specifying five calibration points as priors for divergence times of certain splits, using a lognormal distribution of prior probability. Fossils provided hard minimum bounds (offset) and mean and standard deviations (SD) were chosen so that the 95% probability limit corresponds to a soft maximum bound. Details on fossil dates for each calibration point are: a prior of 390 MY was used for the divergence of the Heterobranchia, based on the oldest known fossil of the Heterobranchia, documented from the Middle Devonian (Bandel and Heidelberger, 2002). Caenogastropods become recognized in the Early Carboniferous (Bandel, 1997) and thus a prior of 350 MY was used as its divergence time. Although possible stem group representatives of modern neogastropods are the Triassic–Cretaceous Maturifusidae (Kaim, 2004), the earliest record of muricoidean gastropods is known from the early Cretaceous. Hence, a normally distributed estimate prior of 140 MY was used for the divergence of the Neogastropoda from the other caenogastropod lineages. Within Heterobranchs, Pyramidelloidea are known since the Early Jurassic (Kaim, 2004), hence a prior of 190 MY was used for the divergence of the Pyramidelloidea from basal pulmonates. Likewise, Acteonidae dates back to the Mid Jurassic (Kaim, 2004), so we considered a prior of 170 MY for the divergence time of the Acteonioidea from the other major groups of opisthobranchs.

3. Results and discussion

3.1. Mitochondrial genome organization and structural features

The complete mitochondrial genome of *I. nautili* was sequenced and assembled as a 15,664 pb circular molecule. The Illumina sequencing produced 289.66 Mb of sequence data (quality score Q30 = 95%) and 81% of the raw reads (2,867,960) passed the adapter and quality trimming thresholds. The final assembly had a sequencing depth over 14,000×. As is the case for most metazoans (Boore, 1999), the mtDNA encodes for 13 protein-coding genes, 22 tRNAs, and 2 rRNAs (Fig. 1). The major strand encodes 29 out of the 37 genes (*cox1*, *cox2*, *trnD*, *atp6*, *atp8*, *rrnS*, *trnV*, *rrnL*, *trnL(uaa)*, *trnL(uag)*, *nad1*, *trnP*, *nad6*, *cob*, *trnS(uga)*, *nad4L*, *nad4*, *trnH*, *nad5*, *trnF*, *cox3*, *trnK*, *trnA*, *trnR*, *trnN*, *trnI*, *nad3*, *trnS(gcu)*, *nad2*). The genes *nad4*/*nad4L* and *atp8*/*atp6* overlapped, respectively. All protein-coding genes start with ATG with the exception of *nad4* that begins with ATA; *cox1*, *cox2*, *atp8*, *atp6*, *cob*, *cox3*, *nad3* and *nad2* end with TAA, and *nad4L*, *nad4* and *nad5* with TAG. The remaining genes (*nad1* and *nad6*) end with a single T, which presumably becomes functional by subsequent polyadenylation of the transcribed messenger

RNAs (Lopez Sanchez et al., 2011). The range in size of the 22 tRNA genes is from 67 to 72 nucleotides. There are 27 noncoding regions, eight of them being longer than 30 base pairs, with a maximum of 56 bps (Fig. 1). The largest one was found adjacent to *cox3* gene, in a position that has been postulated as candidate to contain the control region in other gastropod mt genomes (Kurabayashi and Ueshima, 2000). Moreover, it has been suggested that some of these intergenic regions may be remnants of translocation events (Hidaka et al., 2012). All these intergenic regions show high A + T frequencies.

The gene order of the mt genome of *I. nautili* was compared against that of other gastropods and a cephalopod (Fig. 2). It was found to be very similar to the gene arrangements reported for caenogastropod mt genomes (Fig. 2). Mitochondrial genome organization in gastropods is prone to rearrangements between main lineages but relatively stable within these, changes being restricted to tRNA genes (Cunha et al., 2009; Grande et al., 2008). Therefore, a mt gene arrangement can be used as a fair proxy to assign any gastropod to one of the main lineages, and in the case of *I. nautili*, its assignment to the Caenogastropoda (Cunha et al., 2009). Within caenogastropods, the closest gene order is that shared by the mt genomes of *O. hupensis*, *C. parthenopeum* and *B. brandaris*, which only differs to that of *I. nautili* in the relative position of the *trnW* gene, which in the former is located between the *trnC* and *trnQ* genes and in the latter is found between the *trnM* and *trnY* genes (Fig. 2). The ancestral position of the *trnW* gene in gastropods was likely between the *trnY* and *trnQ* genes, as is found in some Cephalopoda (Yokobori et al., 2004), Polyplacophora (Boore and Brown, 1994) and some Bivalvia (Plazzi et al., 2013). Within gastropods, Vetigastropoda, Neritimorpha, and Caenogastropoda have the *trnC* normally between *trnY* and *trnW* (the relative position of the *trnC* could be a molecular synapomorphy indicating a common ancestor of the three groups) (Castro and Colgan, 2010) (Fig. 2). In *I. nautili*, the *trnW* has been transposed to the region between the *trnM* and *trnY* genes. This location is shared with genus *Alviniconcha* but not with other Abyssochrysoidea that show the typical arrangement of Caenogastropoda (Hidaka et al., 2012). Therefore, the transposition of the *trnW* likely occurred in the common ancestor of *Ifremeria* and *Alviniconcha* (Hidaka et al., 2012).

3.2. Phylogenetic analyses

The molecular phylogeny of Caenogastropoda was reconstructed based on the mt, nuclear and combined data sets using ML and BI. After removing ambiguously aligned positions, the final mt amino acid matrix contained 3091 sites. Both, ML (−lnL = 53,530.05) and BI (−lnL = 61,906.69 for run1; −lnL = 61,907.30 for run2) analyses based on the mt data set arrived at the same tree topology, and only showed differences in branch lengths and levels of support (Fig. 3). The reconstructed tree recovered two highly supported clades, one consisting of Patellogastropoda and Heterobranchia, and the other including Vetigastropoda as sister group of Neritimorpha and Caenogastropoda (Fig. 3). Within Caenogastropoda, the superfamily Vermetoidea was recovered as sister group of the remaining caenogastropod superfamilies (Fig. 3). The reconstructed tree placed *I. nautili* deep within Caenogastropoda, as sister group of Tonnoidea and Neogastropoda (Muricoidea and Conoidea) (Fig. 3) with high statistical support (83% bootstrap; 0.98 posterior probability).

The nuclear matrix was analyzed at the nucleotide level, and had a final length of 1297 sites. The ML (−lnL = 7530.36) and BI

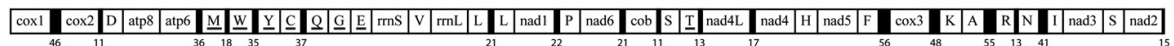


Fig. 1. Gene organization of the mitochondrial genome of *Ifremeria nautili* (Abyssochrysoidea). Genes encoded by the opposite strand are underlined. The intergenic regions longer than 10 positions are shown.

[illegible]

Fig. 2. Mitochondrial gene arrangements of main lineages of gastropods and a cephalopod. Note major gene rearrangements among main gastropod lineages and relatively stable gene orders (with changes restricted to rRNA genes) within them.

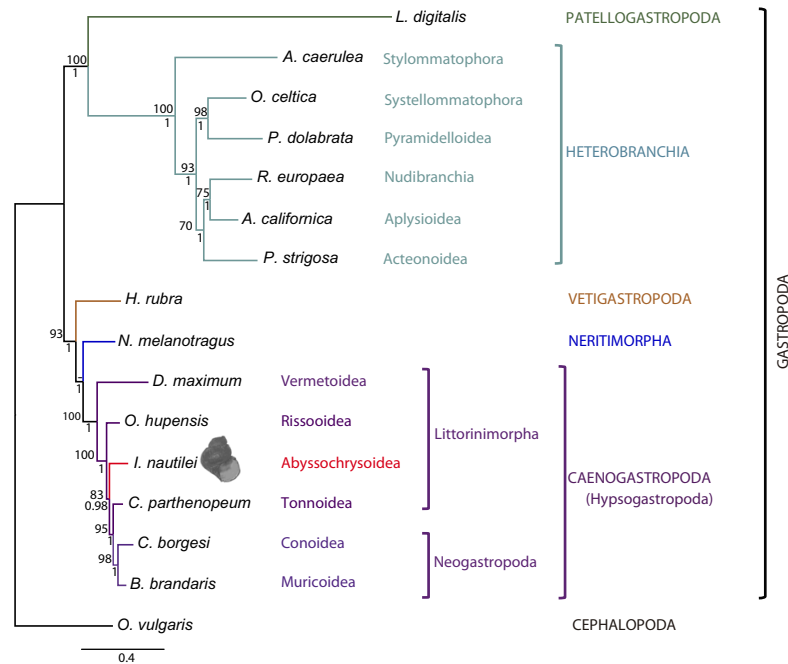


Fig. 3. Phylogenetic relationships of Gastropoda based on the mt data set. The ML phylogram is shown. Numbers at nodes are support values from ML (bootstrap proportions; above) and BI (posterior probabilities; below). Dashes (–) indicate values below 70% bootstrap support or 0.90 Bayesian posterior probabilities. Names of major clades of gastropods are shown in capitals, and superfamilies within Caenogastropoda are indicated. Scale bar is substitutions/site.

($-\ln L = 7631.83$ for run1; $-\ln L = 7632.10$ for run2) analyses based on the nuclear data set arrived at the same tree topology, and only showed differences in branch lengths and levels of support (Fig. 4).

Patellogastropoda was placed as sister group of the remaining gastropods with high support (Fig. 4). Neritimorpha was recovered as sister group of Vetigastropoda whereas Caenogastropoda was grouped with

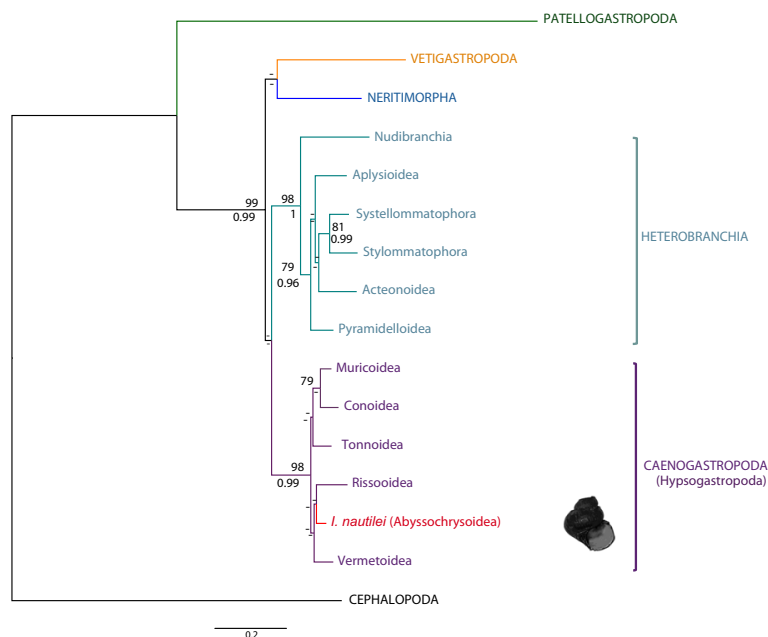


Fig. 4. Phylogenetic relationships of Gastropoda based on the nuclear data set. The ML phylogram is shown. Numbers at nodes are support values from ML (bootstrap proportions; above) and BI (posterior probabilities; below). Dashes (–) indicate values below 70% bootstrap support or 0.90 Bayesian posterior probabilities. Names of major clades of gastropods are shown in capitals, and superfamilies within Caenogastropoda are indicated. Scale bar is substitutions/site.

Heterobranchia (Fig. 4). The statistical supports of both clades were low. The genus *Ifremeria* was placed within Caenogastropoda, although internal relationships within this group were unresolved (Fig. 4).

The combined data set had a final alignment of 4388 positions. In this case, the ML ($-\ln L = 61,607.40$) and BI ($-\ln L = 69,984.47$ for run1; $-\ln L = 69,987.43$ for run2) inferred topologies differed only in the relative position of Vetigastropoda (affecting the only two nodes in the tree without strong statistical support) (Fig. 5). Both trees recovered Patellogastropoda as sister group of Heterobranchia. In the ML tree, Vetigastropoda and Neritimorpha form a clade (with low support), which is the sister group of Caenogastropoda (70% bootstrap). In the BI tree, Vetigastropoda is recovered unusually as sister group of the remaining gastropods (whose relative relationships are the same as in the ML tree) but without support (not shown). In both trees, *Ifremeria* is recovered deep within Caenogastropoda as sister group of the superfamily Tonnoidea and Neogastropoda (superfamilies Muricoidea and Conoidea) (Fig. 5).

Phylogenetic analyses reconstructed remarkably different topologies depending on the data set analyzed. Commonly, Patellogastropoda is considered the sister group of the remaining gastropods (e.g., Ponder and Lindberg, 1997), and as such is placed in the nuclear-based phylogeny. Instead, the mt-based and combined phylogenies recover Patellogastropoda as sister group of Heterobranchia with maximal support (Arques et al., 2014; Grande et al., 2008). It has been suggested that this result could be due to a long-branch attraction (LBA) phenomenon (Grande et al., 2008; Stöger and Schrödl, 2013). However, *Lottia* has a long branch, regardless of the marker, and the effect of the LBA would be to push the branch of Patellogastropoda next to the root not to Heterobranchia. Therefore, the unusual position of Patellogastropoda has to be associated to a mt-specific feature, which could be the extraordinary level of gene rearrangement of the mt genome of *Lottia*, which could be introducing e.g. strand biases (Hassanin et al., 2005). Resolution of this particular node would require the sequencing of the complete mt genomes of other representatives of the other clades within Patellogastropoda

(e.g. *Patella*). Another commonly recognized hypothesis of gastropods is that suggesting a sister group relationship of Caenogastropoda and Heterobranchia (Apogastropoda) as proposed by Ponder and Lindberg (1997) based on morphology. This clade is recovered in the nuclear-based phylogeny, although without statistical support. Instead, the mt-based and combined phylogenies recover a highly supported clade including Caenogastropoda, Vetigastropoda, and Neritimorpha, which would be in agreement with the sharing of the relative position of the *trnC* gene by the three groups. Whether Neritimorpha and Vetigastropoda are sister groups (nuclear and combined, this study; Arques et al., 2014; Williams et al., 2014) or not (mt, this study; Aktipis and Giribet, 2010; Castro and Colgan, 2010) would remain an open question.

While the monophyly of Caenogastropoda is strongly supported both by morphological and molecular studies (e.g. Ponder and Lindberg, 1997; Strong, 2003; Colgan et al., 2007; Williams et al., 2014) as well as by our reconstructed trees, phylogenetic interrelationships within the clade at the family and superfamily levels remain largely unresolved, with many higher taxa probably being paraphyletic or even polyphyletic (Colgan et al., 2007; Cunha et al., 2009; Williams et al., 2014). In this regard, the mt-based and combined phylogenies recover Littorinimorpha as paraphyletic with respect to Neogastropoda with high statistical support. Moreover, the nuclear-based phylogeny finds Littorinimorpha to be polyphyletic (due to a closer relationship of Tonnoidea to Neogastropoda), although with low statistical support. The relatively basal position of Vermetoidea in all trees is against morphological phylogenies (e.g., Strong, 2003) and previous molecular studies (Colgan et al., 2007), and needs to be taken with caution due to the long branch of the vermetid genus *Dendropoma* and major gene order rearrangement of its mtDNA (Rawlings et al., 2010). Altogether, these results prompt for a revision of the Hypsogastropoda (Littorinimorpha + Neogastropoda) using both complete mt genomes and several nuclear genes, and with an extended taxon sampling that includes representatives of all superfamilies within the group (thus far, most reported complete mt genomes of caenogastropods have concentrated mainly on Neogastropoda (Cunha et al., 2009) with few representatives of more basal lineages such as

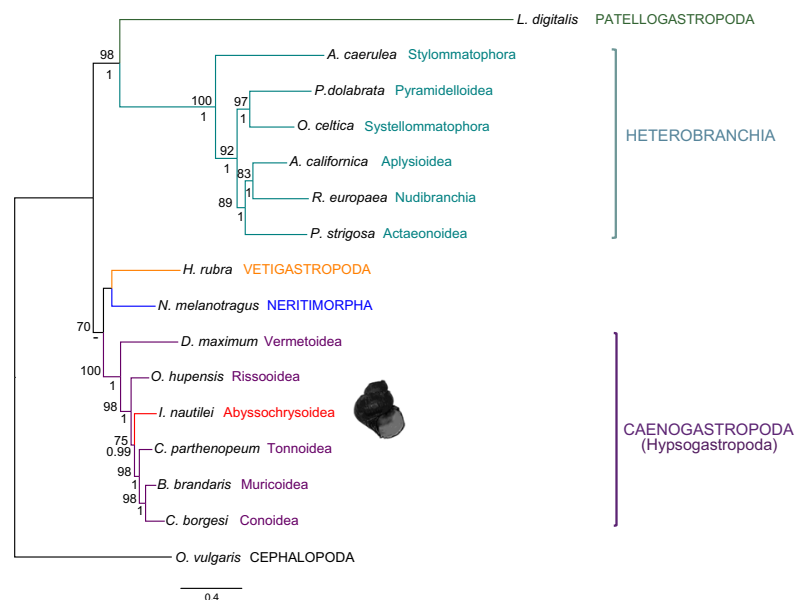


Fig. 5. Phylogenetic relationships of Gastropoda based on the combined data set. The ML phylogram is shown. Numbers at nodes are support values from ML (bootstrap proportions; above) and BI (posterior probabilities; below). Dashes (–) indicate values below 70% bootstrap support or 0.90 Bayesian posterior probabilities. The BI tree differs only in the relative phylogenetic position of *Haliotis*. Names of major clades of gastropods are shown in capitals, and superfamilies within Caenogastropoda are indicated. Scale bar is substitutions/site.

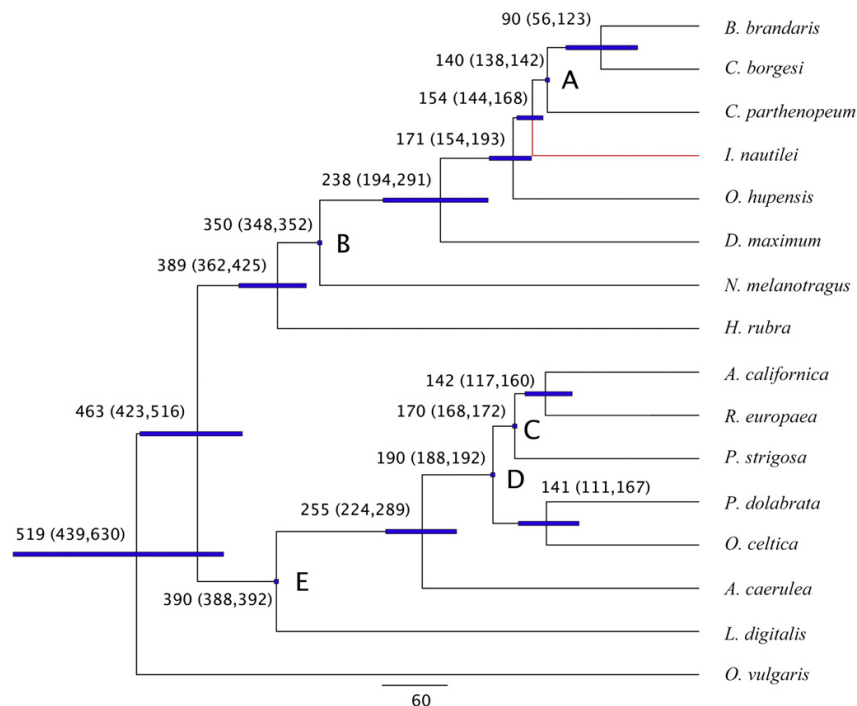


Fig. 6. Timetree with age estimates of major divergence events among gastropods, based on the mt data set, and using Bayesian relaxed dating methods (BEAST). The ingroup was constrained to be monophyletic with respect to the outgroup (*Octopus*). Horizontal bars represent 95% credibility intervals of relevant nodes, and calibration constraints are indicated on the corresponding nodes (A to E). Dates (and credibility intervals) are in millions of years.

Vermetidae–Vermetoidea (Rawlings et al., 2010), or Pomatiopsidae–Rissooidea (Zhao et al., 2010)).

Ever since its description, the family Provannidae was postulated to belong to the Caenogastropoda, although with uncertain phylogenetic position (Bouchet and Rocroi, 2005; Warén and Bouchet, 2001; Warén and Ponder, 1991). According to our results, *Ifremeria* is nested deep within the Hypsogastropoda among the superfamilies that constitute the Littorinimorpha evolutionary grade. These results would be in agreement with a previous 16S-based phylogeny (Colgan et al., 2007) and observed affinities of *Provanna* and Littorinoidea at the sperm ultra-structure (Healy, 1990).

3.3. Divergence times

The reconstructed relaxed timetree (Fig. 6) placed the origin of gastropods about 517 MYA. The earliest fossil assigned to mollusks is *Kimberella* (Fedonkin and Waggoner, 1997) from the Late Precambrian that dates back to 558–555 MYA. Hence, our results support that the early diversification of the main classes of mollusks (including Gastropoda) occurred right after the origin of the phylum. The diversification of the crown group of Caenogastropoda started about 238 MYA, and a radiation pattern (accelerated rates of diversification) is detected between 172 and 140 MYA when the main superfamilies of derived caenogastropods originated. The divergence of the Abysochrysoidea from other caenogastropods occurred about 154 (144–168) MYA. This is in agreement with the oldest reliable fossil record of Abysochrysoidea, *Acanthostrophia acanthica* from Italy that traces back to the Middle Jurassic (Bajocian; 168–170 MYA) (Kaim et al., 2008). The earliest fossils of the families Provannidae and Hokkaidoconchidae are also found in seep deposits that date back to the Late Jurassic (Kaim et al., 2008; Kiel, 2010; Kiel et al., 2008). Overall, the position of *Ifremeria* in the reconstructed molecular phylogeny and the divergence time

corresponding to that node in the timetree support that the origin of the Abysochrysoidea is relatively modern (Late Mesozoic–Early Cenozoic), in agreement with the fossil record (Little and Vrijenhoek, 2003) and within the range (93–228 MYA) inferred based on universal mt and nuclear fragments (Johnson et al., 2010). In this regard, it has been proposed that most of the deep-sea fauna went extinct during the Cenomanian–Turonian anoxic event in the Early Cretaceous, and that modern vent and seep faunas occupied the empty niches, expanding from shallower water refugia (Jacobs and Lindberg, 1998).

Acknowledgments

We are indebted to Hans Tøre Rapp for the gift of a specimen of *I. nautili*. We thank Silvia Perea for the support with the BEAST software and Etienne Kornobis for the help with the assembly of the mtDNA. Federico Abascal provided insightful comments on a previous version of the manuscript. We thank David A. Ray and two anonymous reviewers for their constructive suggestions. We are grateful for the technical assistance provided by J.M. García-Lobo, M. Cruz-Rodríguez, and I. Varela of the Servicio de Secuenciación Masiva (Universidad de Cantabria-IBBTec) for the next-generation library preparation and handling. We are indebted to J. Marco and L. Cabellos who provided access to the supercomputer Altamira at the Institute of Physics of Cantabria (IFCA-CSIC), member of the Spanish Supercomputing Network, for performing phylogenetic analyses. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2007-60954 and CGL2010-18216 to RZ; BES-2008-009562 to DO).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.040>.

References

- Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D., 2005. ProfTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104–2105.
- Abascal, F., Posada, D., Zardoya, R., 2007. MtAnr: a new model of amino acid replacement for Arthropoda. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1–5.
- Aktipis, S.W., Giribet, G., 2010. A phylogeny of Vetigastropoda and other “archaeogastropods”: re-organizing old gastropod clades. *Invertebr. Biol.* 129, 220–240.
- Andrews, S., 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online at <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Arques, M., Colgan, D., Castro, L.R., 2014. Sequence and comparison of mitochondrial genomes in the genus *Nerita* (Gastropoda: Neritimorpha: Neritidae) and phylogenetic considerations among gastropods. *Mar. Genomics* 15, 45–54.
- Bandel, K., 1997. Higher classification and pattern of evolution of the Gastropoda. A synthesis of biological and paleontological data. *Cour. Forsch. Senckenb.* 201, 57–81.
- Bandel, K., Heideberger, D., 2002. A Devonian member of the subclass Heterostropha (Gastropoda) with valvatoid shell shape. *N. Jb. Geol. Paläont. (Monatsh.)* 2002, 533–550.
- Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritzsche, G., Pütz, J., Middendorf, M., Stadler, P.F., 2013. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 313–319.
- Boore, J., 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27, 1767–1780.
- Boore, J., Brown, W., 1994. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the black chiton, *Katharina tunicata*. *Genetics* 138, 423–443.
- Boore, J., Brown, W., 2000. Mitochondrial genomes of *Galathea*, *Helobdella*, and *Platynereis*: sequence and gene arrangement comparisons indicate that Pogonophora is not a phylum and Annelida and Arthropoda are not sister taxa. *Mol. Biol. Evol.* 17, 87–106.
- Boore, J., Macey, J., Medina, M., 2005. Sequencing and comparing whole mitochondrial genomes of animals. *Methods Enzymol.* 395, 311–348.
- Bouchet, P., Rocroi, J.P., 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia* 47, 397.
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552.
- Castro, L.R., Colgan, D.J., 2010. The phylogenetic position of Neritimorpha based on the mitochondrial genome of *Nerita melanotragus* (Mollusca: Gastropoda). *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 918–923.
- Colgan, D.J., Ponder, W.F., Beacham, E., Macaranas, J., 2007. Molecular phylogenetics of Caenogastropoda (Gastropoda: Mollusca). *Mol. Phylogenet. Evol.* 42, 717–737.
- Cunha, R., Grande, C., Zardoya, R., 2009. Neogastropod phylogenetic relationships based on entire mitochondrial genomes. *BMC Evol. Biol.* 9, 210.
- Drummond, A., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- Fedonkin, M.A., Waggoner, B.M., 1997. The Late Precambrian fossil *Kimberella* is a mollusc-like bilaterian organism. *Nature* 388, 868–871.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–376.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Grande, C., Templado, J., Cervera, J.L., Zardoya, R., 2002. The complete mitochondrial genome of the nudibranch *Robostra europaea* (Mollusca: Gastropoda) supports the monophyly of opisthobranchs. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1672–1685.
- Grande, C., Templado, J., Zardoya, R., 2008. Evolution of gastropod mitochondrial genome arrangements. *BMC Evol. Biol.* 8, 61.
- Hassanin, A., Léger, N., Deutsch, J., 2005. Evidence for multiple reversals of asymmetric mutational constraints during the evolution of the mitochondrial genome of metazoa, and consequences for phylogenetic inferences. *Syst. Biol.* 54, 277–298.
- Hatzoglou, E., Rodakis, G., Lecanidou, R., 1995. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinaria coerulea*. *Genetics* 140, 1353–1366.
- Healy, J.M., 1990. Taxonomic affinities of the deep-sea genus *Provanna* (Caenogastropoda): new evidence from sperm ultrastructure. *J. Molluscan Stud.* 56, 119–122.
- Hidaka, H., Watanabe, H., Kano, Y., Kojima, S., 2012. Mitochondrial genome rearrangement in a hydrothermal vent-endemic lineage of provannid gastropods provides a new DNA marker for phylogeographical studies. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 93, 1053–1058.
- Houbrick, R.S., 1979. Classification and Systematic Relationships of the Abyssochrysidae, a Relict Family of Bathyal Snails (Prosobranchia: Gastropoda). Smithsonian Institution Press, Washington DC.
- Huelsenbeck, J., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Jacobs, D.K., Lindberg, D.R., 1998. Oxygen and evolutionary patterns in the sea: onshore/offshore trends and recent recruitment of deep-sea faunas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9396–9401.
- Johnson, S.B., Warén, A., Lee, R.W., Kano, Y., Kaim, A., Davis, A., Strong, E.E., Vrijenhoek, R. C., 2010. *Rubyspira*, new genus and two new species of bone-eating deep-sea snails with ancient habits. *Biol. Bull.* 219, 166–177.
- Kaim, A., 2004. The Evolution of Conch Ontogeny in Mesozoic Open Sea Gastropods. Instytut Paleobiologii PAN im. Romana Kozłowskiego, Warszawa.
- Kaim, A., Jenkins, R.G., Warén, A., 2008. Provannid and provannid-like gastropods from the Late Cretaceous cold seeps of Hokkaido (Japan) and the fossil record of the Provannidae (Gastropoda: Abyssochrysoidea). *Zool. J. Linnean Soc.* 154, 421–436.
- Kaim, A., Tücholtke, B.E., Warén, A., 2012. A new Late Pliocene large provannid gastropod associated with hydrothermal venting at Kane Megamullion, Mid-Atlantic Ridge. *J. Syst. Paleontol.* 10, 423–433.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.I., Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066.
- Kiel, S., 2008. An unusual new gastropod from an Eocene hydrocarbon seep in Washington State. *J. Paleontol.* 82, 188–191.
- Kiel, S., 2010. The fossil record of vent and seep mollusks. In: Kiel, S. (Ed.), *The Vent and Seep Biota*, Topics in Geobiology, 33. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 255–277.
- Kiel, S., Little, C.T.S., 2006. Cold-seep mollusks are older than the general marine mollusk fauna. *Science* 313, 1429–1431.
- Kiel, S., Campbell, K.A., Elder, W.P., Little, C.S.T., 2008. Jurassic and Cretaceous gastropods from hydrocarbon seeps in forearc basin and accretionary prism settings, California. *Acta Palaeontol. Pol.* 53, 679–703.
- Knudsen, B., Kohn, A.B., Nahir, B., McFadden, C.S., Moroz, L.L., 2006. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the sea slug, *Aplysia californica*: conservation of the gene order in Euthyneura. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38.
- Kojima, S., Segawa, R., Fujiwara, Y., Hashimoto, J., Ohta, S., 2000. Genetic differentiation of populations of a hydrothermal vent-endemic gastropod, *Ifremeria nautilei*, between the North Fiji Basin and the Manus Basin revealed by nucleotide sequences of mitochondrial DNA. *Zool. Sci.* 17, 1167–1174.
- Kurabayashi, A., Ueshima, R., 2000. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematic implication of the genome organization. *Mol. Biol. Evol.* 17, 266–277.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1695–1701.
- Laslett, D., Canback, B., 2008. ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences. *Bioinformatics* 24, 172–175.
- Little, C.T.S., Vrijenhoek, R.C., 2003. Are hydrothermal vent animals living fossils? *Trends Ecol. Evol.* 18, 582–588.
- Lopez Sanchez, M.I.G., Mercer, T.R., Davies, S.M.K., Shearwood, A.-M.J., Nygård, K.K.A., Richman, T.R., Mattick, J.S., Rackham, O., Filipovska, A., 2011. RNA processing in human mitochondria. *Cell Cycle* 10, 2904–2916.
- Maynard, B., Kerr, L., McKiernan, J., Jansen, E., Hanna, P., 2005. Mitochondrial DNA sequence and gene organization in Australian abalone *Haliotis rubra* (leach). *Mar. Biotechnol. (N.Y.)* 7, 645–658.
- McArthur, A.G., Koop, B.F., 1999. Partial 28S rDNA sequences and the antiquity of hydrothermal vent endemic gastropods. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13, 255–274.
- McArthur, A.G., Tunncliffe, V., 1998. Relics and antiquity revisited in the modern vent fauna. *Geol. Soc. Lond. Spec. Publ.* 148, 271–291.
- Newman, W.A., 1985. The abyssal hydrothermal vent invertebrate fauna: a glimpse of antiquity? In: Jones, M.L. (Ed.), *The hydrothermal vents of the Eastern Pacific: an overview*. Bull. Biol. Soc. Washington, pp. 231–242.
- Peek, A.S., Gustafson, R.G., Lutz, R.A., Vrijenhoek, R.C., 1997. Evolutionary relationships of deep-sea hydrothermal vent and cold-water seep clams (Bivalvia: Vesicomyidae): results from the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *Mar. Biol.* 130, 151–161.
- Plazzi, F., Ribani, A., Passamonti, M., 2013. The complete mitochondrial genome of *Solemya velum* (Mollusca: Bivalvia) and its relationships with Conchifera. *BMC Genomics* 14, 409.
- Ponder, W.F., Lindberg, D.R., 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. *Zool. J. Linnean Soc.* 119, 83–265.
- Ponder, W.F., Colgan, D.J., Healy, J.M., Nützel, A., Simone, L.R.L., Strong, E.E., 2008. Caenogastropoda. In: Ponder, W.F., Lindberg, D.R. (Eds.), *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. Univ. California Press, California, pp. 331–383.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2007. Tracer v1.4. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rawlings, T., MacInnis, M., Bieler, R., Boore, J., Collins, T., 2010. Sessile snails, dynamic genomes: gene rearrangements within the mitochondrial genome of a family of caenogastropod molluscs. *BMC Genomics* 11, 440.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Sasaki, T., Warén, A., Kano, Y., Okutani, T., Fujikura, K., 2010. Gastropods from recent hot vent and cold seeps: systematics, diversity and life strategies. In: Kiel, S. (Ed.), *The Vent and Seep Biota*, Topics in Geobiology, 33. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 169–254.
- Schattner, P., Brooks, A., Lowe, T., 2005. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucleic Acids Res.* 33, W686–W689.
- Schmieder, R., Edwards, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863–864.
- Shank, T.M., Black, M.B., Halanich, K.M., Lutz, R.A., Vrijenhoek, R.C., 1999. Miocene radiation of deep-sea hydrothermal vent shrimp (Caridea: Bresiliidae): evidence from mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13, 244–254.
- Simson, W., Lindberg, D., Boore, J., 2006. Rolling circle amplification of metazoan mitochondrial genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 562–567.
- St John, J., 2011. SeqPrep 1.1. Tripping Adaptors and/or Merging Paired Reads with Overlap into Single Reads. Available online at <https://github.com/jstjohn/SeqPrep>.
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690.
- Ströger, I., Schrödl, M., 2013. Mitogenomics does not resolve deep molluscan relationships (yet?). *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 376–392.
- Strong, E.E., 2003. Refining molluscan characters: morphology, character coding and a phylogeny of the Caenogastropoda. *Zool. J. Linnean Soc.* 137, 447–554.
- Suzuki, Y., Kojima, S., Sasaki, T., Suzuki, M., Utsumi, T., Watanabe, H., Urakawa, H., Tsuchida, S., Nunoura, T., Hirayama, H., Takai, K., Nealson, K.H., Horikoshi, K., 2006.

- Host-symbiont relationships in hydrothermal vent gastropods of the genus *Alviniconcha* from the Southwest Pacific. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1388–1393.
- Thaler, A.D., Zelnio, K., Saleu, W., Schultz, T.F., Carlsson, J., Cunningham, C., Vrijenhoek, R. C., Van Dover, C.L., 2011. The spatial scale of genetic subdivision in populations of *Ifremeria nautilei*, a hydrothermal-vent gastropod from the southwest Pacific. *BMC Evol. Biol.* 11, 372.
- Tunnicliffe, V., 1992. The nature and origin of the modern hydrothermal vent fauna. *Palaos* 7, 338–350.
- Van Dover, C.L., 2000. *The Ecology of Deep-Sea Hydrothermal Vents*. Princeton University Press, Princeton.
- Van Dover, C.L., German, C.R., Speer, K.G., Parson, L.M., Vrijenhoek, R.C., 2002. Evolution and biogeography of deep-sea vent and seep invertebrates. *Science* 295, 1253–1257.
- Warén, A., Bouchet, P., 2001. Gastropoda and Monoplacophora from hydrothermal vents and seeps; new taxa and records. *Veliger* 44, 116–231.
- Warén, A., Ponder, W.F., 1991. New species, anatomy, and systematic position of the hydrothermal vent and hydrocarbon seep gastropod family Provannidae fam.n. (Caenogastropoda). *Zool. Scr.* 20, 27–56.
- Williams, S.T., Foster, P.G., Littlewood, D.T.J., 2014. The complete mitochondrial genome of a turbinid vetigastropod from MiSeq Illumina sequencing of genomic DNA and steps towards a resolved gastropod phylogeny. *Gene* 533, 38–47.
- Wyman, S., Jansen, R., Boore, J., 2004. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics* 20, 3252–3255.
- Yang, J.-S., Lu, B., Chen, D.-F., Yu, Y.-Q., Yang, F., Nagasawa, H., Tsuchida, S., Fujiwara, Y., Yang, W.-J., 2013. When did decapods invade hydrothermal vents? Clues from the Western Pacific and Indian Oceans. *Mol. Biol. Evol.* 30, 305–309.
- Yokobori, S.-i, Fukuda, N., Nakamura, M., Aoyama, T., Oshima, T., 2004. Long-term conservation of six duplicated structural genes in cephalopod mitochondrial genomes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 2034–2046.
- Zhao, Q.-P., Zhang, S.H., Deng, Z.-R., Jiang, M.-S., Nie, P., 2010. Conservation and variation in mitochondrial genomes of gastropods *Oncomelania hupensis* and *Tricula hortensis*, intermediate host snails of *Schistosoma* in China. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 215–226.

3.3 PUBLICACIÓN 3: CAENOGASTROPOD MITOGENOMICS

Título: "Caenogastropod mitogenomics"

Autores: David Osca, José Templado, Rafael Zardoya

Estado: ACEPTADO

Año: 2015

Revista: Molecular, Phylogenetics and Evolution

Resumen:

Con el fin de profundizar en las relaciones filogenéticas de los Caenogastropoda, se secuenciaron los genomas mitocondriales completos de *Cochlostoma hidalgoi* (Cyclophoroidea), *Naticarius hebraeus* (Naticoidea), *Galeodea echinophora* (Tonnoidea) y *Columbella adansoni* (Buccinoidea), así como el genoma parcial de *Erosaria spurca* (Cypraeoidea).

El orden génico de todos los genomas mitocondriales resultaron acordes con el típico de los Caenogastropoda, excepto el de *C. hidalgoi*, que difiere en la posición relativa de los genes trna-D, trna-Q, trna-G, trna-Y y trna-T. La reconstrucción filogenética del árbol de Caenogastropoda fue realizada mediante métodos probabilísticos y basada en las secuencias aminoacídicas deducidas de los genes codificantes de proteínas concatenados. La reconstrucción filogenética recuperó Architaenioglossa (superfamilias Cyclophoroidea, Ampullarioidea y Viviparoidea) como grado basal. La monofilia de Sorbeoconcha (todos los Caenogastropoda excepto Architaenioglossa) también se recuperó en casi todos los análisis filogenéticos (excluyendo Vermetoidea, que presenta una rama muy larga). La posición relativa de Cerithioidea con respecto a Hypsogastropoda quedó sin resolver, mientras que la monofilia de Hypsogastropoda resultó fuertemente apoyada. Dentro de este clado, los resultados muestran que Littorinimorpha debe considerarse como un grado

(parafiletico) y que varias superfamilias (Abyssochrysoidea, Rissooidea, Truncatelloidea y Naticoidea) se fueron separando sucesivamente hasta llegar al clado de especies sifonadas (Stromboidea, Cypraeoidea, Tonnoidea y Neogastropoda) que fue ampliamente apoyado. La posición relativa de Vermetoidea no pudo determinarse debido a problemas de atracción de ramas largas derivado de su mitogenoma altamente modificado. La superfamilia Tonnoidea resultó dentro de Neogastropoda, cuestionando así la monofilia de este grupo tal como se define tradicionalmente. Por otro lado, los Muricoidea resultaron polifiléticos, y su monofilia solo es posible considerando Volutoidea y Babylonioidea como superfamilias independientes.

YMPEV 5246
27 July 2015

ARTICLE IN PRESS

No. of Pages 11, Model 5G

Molecular Phylogenetics and Evolution xxx (2015) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Phylogenetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ympev



Caenogastropod mitogenomics[☆]

David Osca, José Templado, Rafael Zardoya^{*}

Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC), José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 March 2015
Revised 11 May 2015
Accepted 18 July 2015
Available online xxxx

Keywords:

Mitochondrial genomes
Caenogastropoda
Architaenioglossa
Littorinimorpha
Hypsogastropoda
Neogastropoda

ABSTRACT

In order to further resolve the phylogenetic relationships within Caenogastropoda, the complete mitochondrial (mt) genomes of *Cochlostoma hidalgoi* (Cyclophoroidea), *Naticarius hebraeus* (Naticoidea), *Galeodea echinophora* (Tonnoidea), and *Columbella adansoni* (Buccinoidea), and the partial mt genome of *Erosaria spurca* (Cypraeoidea) were sequenced. All newly determined mt genomes conformed to the consensus gene order of caenogastropods, except that of *C. hidalgoi*, which differed in the relative positions of the *trnD*, *trnQ*, *trnG*, *trnY*, and *trnT* genes. Phylogenetic reconstruction of the caenogastropod tree was performed using probabilistic methods and based on the deduced amino acid sequences of concatenated mt protein coding genes. The reconstructed phylogeny recovered Architaenioglossa (superfamilies Cyclophoroidea, Ampullarioidea, and Viviparoidea) as a grade. The monophyly of Sorbeoconcha (all caenogastropods but Architaenioglossa) was supported by most but not all phylogenetic analyses (excluding Vermetoidea, which has a long branch). The relative phylogenetic position of Cerithioidea with respect to Hypsogastropoda remains unresolved. The monophyly of Hypsogastropoda (without Vermetoidea) is strongly supported. Within this clade, Littorinimorpha should be considered a grade. Several superfamilies (Abyssochrysoidea, Rissooidea, Truncatelloidea, and Naticoidea) branched off successively before a siphonate clade (Stromboidea, Cypraeoidea, Tonnoidea, Neogastropoda), which is strongly supported. The relative phylogenetic position of Vermetoidea could not be determined due to long-branch attraction artifacts. The superfamily Tonnoidea was recovered within Neogastropoda, which questions the monophyly of the latter as traditionally defined. We propose to resolve the polyphyly of Muricoidea by erecting two new superfamilies Volutioidea and Babyloniioidea.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

With thousands of described species, the caenogastropods (periwinkles, whelks, cones, cowries, miters, etc.) constitute the largest and most evolutionary successful group of living gastropods (Ponder et al., 2008). These snails are highly diverse in the morphology of their typically coiled shell, exhibit a wide variety of dietary specializations (detritus feeders, suspension feeders, algal grazers, carnivores, parasites), and are adapted to very different marine, freshwater and terrestrial habitats worldwide (being particularly abundant in the tropics; Colgan et al., 2007). According to the fossil record, the extraordinary diversity of extant caenogastropods (about 140 families according to the most recent comprehensive classification by Bouchet and Rocroi (2005) and the WoRMS database; <http://www.marinespecies.org/>) was generated

in successive radiations during the upper Mesozoic and lower Cenozoic (Bandel, 1993).

The clade Caenogastropoda was originally created by Cox (1960) to accommodate most Mesogastropoda and all Stenoglossa of Thiele (1929–35), but current understanding of Caenogastropoda broadly follows the morphological cladistic treatment of the overall gastropod phylogeny by Ponder and Lindberg (1997). Within Caenogastropoda, two higher groups are recognized, Architaenioglossa and Sorbeoconcha (Bouchet and Rocroi, 2005; Colgan et al., 2007; Ponder and Lindberg, 1997; Strong, 2003). The Architaenioglossa include the freshwater Ampullarioidea and Viviparoidea, and the terrestrial Cyclophoroidea. The Sorbeoconcha include the Cerithioidea, the Campaniloidea, and the Hypsogastropoda. This latter group contains the majority of the diversity of caenogastropods, and was provisionally divided into three main groups, Littorinimorpha, Ptenoglossa, and Neogastropoda (=Stenoglossa) (Bouchet and Rocroi, 2005; Ponder and Lindberg, 1997). While the monophyly of the Caenogastropoda is generally not questioned either with morphology (Bouchet and Rocroi, 2005; Ponder and Lindberg, 1997; Strong, 2003; but see Haszprunar, 1988) or with molecules

[☆] This paper was edited by the Associate Editor Jan Strugnell.

^{*} Corresponding author.

E-mail addresses: davidosca@mncn.csic.es (D. Osca), templado@mncn.csic.es (J. Templado), rafaz@mncn.csic.es (R. Zardoya).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.011>
1055-7903/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Osca, D., et al. Caenogastropod mitogenomics. Mol. Phylogenet. Evol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.011>

(Colgan et al., 2007; Harasewych et al., 1998; McArthur and Harasewych, 2003; Osca et al., 2014a; Zapata et al., 2014), the monophyly and phylogenetic relationships of the above mentioned main lineages within the group are under constant debate and revision (Colgan et al., 2007; Ponder et al., 2008). For instance, several morphological studies suggested that Architaenioglossa could represent a grade (Haszprunar, 1988; Ponder et al., 2008; Ponder and Lindberg, 1997) and considered Ptenoglossa non-monophyletic (Ponder and Lindberg, 1997), whereas several molecular studies fail to recover the monophyly of Littorinimorpha and Neogastropoda (Colgan et al., 2007; Cunha et al., 2009).

Morphological phylogenies of Caenogastropoda have been hampered by the difficulty in defining character homology and character states, as well as because numerous characters are prone to convergence (Ponder et al., 2008; see Sigwart and Lindberg, 2014 for a more general pattern affecting mollusc phylogenies). In addition, it has been difficult to make compatible the rich fossil data of the group with phylogenies and classifications based on extant taxa (Ponder et al., 2008). Similarly, molecular studies had their own caveats. While some early molecular phylogenies were based on relatively short sequences (Harasewych et al., 1998), others had a biased representation of the main lineages of Caenogastropoda (Aktipis and Giribet, 2010; Cunha et al., 2009; McArthur and Harasewych, 2003; Williams et al., 2014). Consequently, the reconstructed molecular phylogenies were mainly characterized by low resolution of the deeper nodes (e.g., Colgan et al., 2007) and contradicting results. The Bayesian phylogenetic tree using combined morphological and molecular data that is reported in Ponder et al. (2008) summarizes the state of the art regarding the phylogeny and systematics of Caenogastropoda. Available data suggests that some of the currently recognized higher taxa (orders, suborders) are probably paraphyletic or even polyphyletic, and the relationships of intermediate groups (superfamilies, families) are unresolved. The monophyly of Architaenioglossa is not recovered whereas the monophyly of Sorbeoconcha is supported with a 0.94 Bayesian posterior probability (BPP; Ponder et al., 2008). Within Sorbeoconcha, the Campaniloidea are recovered as sister group of Cerithioidea and Hypsogastropoda, although with low statistical support. The monophyly of Hypsogastropoda is highly supported (0.98 BPP) and the group is divided into two low supported clades of siphonate (with siphonal canal) and asiphonate (without siphonal canal) snails, respectively (Ponder et al., 2008; Vermeij, 2007). Within the asiphonates (including e.g., Naticoidea, Littorinoidea, Vermetoidea, and Rissooidea), phylogenetic relationships are unresolved whereas within the siphonates, resolution is high, and the following lineages branch off successively: (1) Calyptraeidea; (2) Stromboidea and Xenophoroidea; (3) Cypraeoidea and Tonnoidea; and (4) Neogastropoda (Ponder et al., 2008). The monophyly of Neogastropoda is supported by several morphological synapomorphies related with the digestive system (Kantor, 1996) but questioned by molecular analyses (Colgan et al., 2007; Cunha et al., 2009).

Complete mitochondrial (mt) genome sequences can be used to reconstruct robust phylogenies if applied at the proper taxonomic level (e.g., San Mauro et al., 2014). Moreover, mt genome arrangements may also contain important phylogenetic information (see e.g., Stöger and Schrödl, 2013 that propose the KARNI cluster of mt tRNAs as molecular synapomorphy of molluscs). When applied to resolve phylogenetic relationships among bilaterians (Bernt et al., 2013) or the main classes of molluscs (Osca et al., 2014a; Stöger and Schrödl, 2013; Schrödl and Stöger, 2014), however, mt sequences show important problems of rate heterogeneity among lineages, which ultimately limit their phylogenetic utility (systematic biases from strand-specific skews as well as correlation of high rates of gene rearrangements and sequence evolution

were proposed as potential causes for inference artifacts; Stöger and Schrödl, 2013; Schrödl and Stöger, 2014). Similarly, the long branches produced by Patellogastropoda (Simison et al., 2006) and Heterobranchia (Grande et al., 2008) mt genomes also hamper the reconstruction of the gastropod phylogenetic tree (Stöger and Schrödl, 2013). However, within the main lineages of gastropods, due to the younger diversification and the rather stable gene arrangements, the use of mt genomes is promising and have rendered in many instances rather resolved phylogenies (Cunha et al., 2009; Grande et al., 2008; Osca et al., 2014b; Williams et al., 2014), which complement those based on nuclear multi-gene sequence data sets (Zapata et al., 2014). Thus far, only two studies utilized complete mt genomes to address phylogenetic relationships within Caenogastropoda, one focused on testing the monophyly of Neogastropoda (Cunha et al., 2009), the other on resolving the relative phylogenetic position of the Abyssochrysoidea (Osca et al., 2014b).

Here, we sequenced a total of four complete, and one partial caenogastropod mt genomes (all selected to fill in important gaps in the caenogastropod tree), and compiled all those available (and non-redundant) for the group in GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). For the first time, we reconstructed a phylogeny of Caenogastropoda including a total of 34 mt genomes that represent the main lineages within the group, with the exception of the Campaniloidea and the superfamilies included within the non-monophyletic Ptenoglossa (Table 1). The reconstructed phylogeny was used to test the monophyly of the classical taxonomic groups recognized within the megadiverse Caenogastropoda, to tackle the open questions about internal phylogenetic relationships, and to investigate the evolution of mt gene rearrangements within the group.

2. Materials and methods

2.1. DNA extraction, PCR amplification and sequencing

One specimen each of *Cochlostoma hidalgovi* (Cyclophoroidea), *Naticarius hebraeus* (Naticoidea), *Erosaria spurca* (Cypraeoidea), *Galeodea echinophora* (Tonnoidea), and *Columbella adansoni* (Buccinoidea) was used for this study (Table 1). All samples were stored in ethanol 100% and total genomic DNA was isolated from up to 1 g of foot tissue following a standard phenol–chloroform extraction. The PCR amplification of the mt genomes followed a three-phase strategy: first, several short fragments per genome were PCR amplified and sequenced using universal primers for *cox1* (Folmer et al., 1994), *rnl* (Palumbi et al., 1991), *rrnS* (Kocher et al., 1989), *nad4* (Shao et al., 2006), *cox3* and *cob* (Boore and Brown, 2000) and standard PCR conditions (Osca et al., 2014a); second, new primers were designed outwards the short fragments; third, the remaining mtDNA was amplified in 2–3 overlapping fragments by long PCR (see Appendix for the specific strategy and long PCR primer sequences for each mt genome). Long PCRs were carried out in 50 µl reactions containing 5 µl of 10× LA Buffer II (Mg²⁺ plus), 8 µl of dNTP Mixture (2.5 mM each), 1 µl of each primer, 0.5 µl of template DNA, 0.5 µl of TaKaRa LA Taq DNA polymerase (5 units/µl), and sterilized distilled water up to 50 µl. The following PCR conditions were used: an initial denaturing step at 98 °C for 30 s; 45 cycles of denaturing at 98 °C for 10 s, annealing at 57 °C for 30 s, and extension at 68 °C for 60 s per kb; and a final extension step at 68 °C for 10 min. Long-PCR products were purified by ethanol precipitation. Long PCR fragments were sequenced either following a shotgun strategy and Sanger sequencing (Osca et al., 2014a) or directly through massive parallel sequencing (Osca et al., 2014b) in an automated DNA sequencer ABI PRISM 3700 at Secugen (Madrid, Spain) or in

Please cite this article in press as: Osca, D., et al. Caenogastropod mitogenomics. Mol. Phylogenet. Evol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.011>

Table 1
Complete caenogastropod mitochondrial (mt) genomes analyzed in this study.

Species	Order	Length (bp)	GenBank acc. no.	Voucher	Location	Collector	Year
New mt genomes							
Naticarius hebraeus	Naticoidea	15.384	KP716634	MNCN/ADN 65236	Castellón	Gilberto Diosdado	2009
Galeodea echinophora	Tonnoidea	15.388	KP716635	MNCN/ADN 65235	Valencia	David Osca	2008
Erosaria spurca ^a	Cypraeoidea	11.107	KP716636	MNCN/ADN 85223	Islas Columbretes	José Templado	2009
Columbella adansoni	Buccinoidea	16.272	KP716637	MNCN/ADN 85224	Playa de la Tejita (Tenerife)	Ivan Acevedo	2009
Cochlostoma hidalgovi	Cyclophoroidea	15.536	KP716638	MNCN/ADN 65237	Valle de Somiedo (La Malva)	José Templado	2009
Species	Order	Length (bp)	GenBank acc. no.	Publication			
GenBank mt genomes							
Marisa cornuarietis	Ampullarioidea	15.923	NC_025334	Wang and Qiu (2014)			
Pomacea canaliculata	Ampullarioidea	15.707	NC_024586	Zhou et al. (2014)			
Cipangopaludina cathayensis	Viviparoidae	17.157	NC_025577	Yang et al. (2014)			
Semisulcospira libertina	Cerithioidea	15.432	NC_023364	Zeng et al. (2014)			
Ifremeria nautilei	Abyssochrysoidea	15.664	NC_024642	Osca et al. (2014)			
Tricula hortensis	Rissooidea	15.179	NC_013833	Zhao et al. (2010)			
Oncomelania hupensis	Rissooidea	15.186	NC_012899	Zhao et al. (2010)			
Potamopyrgus antipodarium	Truncatelloidea	15.110	NC_020790	Neiman et al. (2010)			
Potamopyrgus estuarius	Truncatelloidea	15.120	NC_021595	Neiman et al. (2010)			
Thylacodes squamigerus	Vermetoidea	15.544	NC_014588	Rawlings et al. (2010)			
Cerastium maximum	Vermetoidea	15.578	NC_014583	Rawlings et al. (2011)			
Lobatus gigas	Stromboidea	15.461	NC_024932	Márquez et al. (2014)			
Bivetiella cancellata	Cancellarioidea	16.648	NC_013241	Cunha et al. (2009)			
Monoplex parthenopeus	Tonnoidea	15.270	NC_013247	Cunha et al. (2009)			
Ilyanassa obsoleta	Buccinoidea	15.263	NC_007781	Simison et al. (2006)			
Nassarius reticulatus	Buccinoidea	15.271	NC_013248	Cunha et al. (2009)			
Cymbium olla	Muricoidea	15.375	NC_013245	Cunha et al. (2009)			
Babylonia areolata	Muricoidea	15.445	NC_023080	Chen and Ke (2013) ^b			
Bolinus brandaris	Muricoidea	15.380	NC_013250	Cunha et al. (2009)			
Rapana venosa	Muricoidea	15.272	NC_011193	Chandler et al. (2007) ^b			
Concholepas concholepas	Muricoidea	15.495	NC_017886	Núñez-Acuña et al. (2013)			
Reishia clavigera	Muricoidea	15.285	NC_010090	Ki et al. (2010)			
Amalda northlandica	Olivoidea	15.354	NC_014403	McComish et al. (2010)			
Fusiturrus similis	Conoidea	15.595	NC_013242	Cunha et al. (2009)			
Lophiotoma cerithiformis	Conoidea	15.800	NC_008098	Bandyopadhyay et al. (2006)			
Oxymuris dimidiata	Conoidea	16.513	NC_013239	Cunha et al. (2009)			
Cylindrella textile	Conoidea	15.562	NC_008797	Bandyopadhyay et al. (2008)			
Pionoconus consors	Conoidea	16.112	NC_023460	Brauer et al. (2012)			
Africonus borgesii	Conoidea	15.536	NC_013243	Cunha et al. (2009)			

^a Nearly complete.

^b Unpublished.

213 an Illumina HiSeq2000 at Macrogen (Seoul, Korea), respectively.
214 Shorter PCR fragments and regions of poor base calling were
215 sequenced using nested PCRs and primer walking (see Appendix).

216 2.2. Genome assembly and annotation

217 Short-read DNA sequences from Illumina were assembled into a
218 single sequence corresponding to a complete mt genome using CLC
219 Genomics Workbench 5.5 (CLC bio, Aarhus, Denmark). Shotgun
220 clone sequences were assembled into a complete mt genome using
221 Sequencher v. 5.0.1 (Gene Codes Co.; Ann Arbor, MI, USA). Gaps in
222 the final circular sequences were closed using sequences obtained
223 through primer walking. The 13 mt protein-coding genes were
224 annotated by identifying their open reading frames and by com-
225 paring them with other reported mollusc mt genomes using the
226 MITOS (Bernt et al., 2013) and DOGMA (Wyman et al., 2004) web-
227 servers. The transfer RNA (tRNA) genes were further identified
228 with tRNAscan-SE 1.21 (Schattner et al., 2005) and ARWEN 1.2
229 (Laslett and Canbäck, 2008), which infer cloverleaf secondary
230 structures. The ribosomal RNA (rRNA) genes were identified by
231 sequence comparison with other reported mollusc mt genomes,
232 and assumed to extend to the boundaries of adjacent genes
233 (Boore et al., 2005). The gene orders of the newly sequenced mt
234 genomes were compared to the gene arrangement of other
235 reported caenogastropod mitochondrial genomes (Table 1), one
236 of Vetigastropoda, *Haliotis rubra* (Maynard et al., 2005), and one
237 of Neritimorpha, *Nerita tessellata* (Arquez et al., 2014).

238 2.3. Sequence alignment

239 The mtDNA sequences of the newly sequenced mt genomes
240 were aligned to the orthologous sequences of 34 complete mt gen-
241 omes of representatives of main caenogastropod lineages (Table 1),
242 as well as the following outgroups: two vetigastropods, *Tegula*
243 *brunnea* (Simison, 2012; unpublished) and *Lunella* aff. *cinerea*
244 (Williams et al., 2014); two neritimorphs, *Nerita tessellata*
245 (Arquez et al., 2014) and *Nerita melanotragus* (Castro and Colgan,
246 2010); six heterobranchs, *Aplysia californica* (Knudsen et al.,
247 2006), *Roboastra europaea* (Grande et al., 2002), *Pupa strigosa*
248 (Kurabayashi and Ueshima, 2000), *Albinaria caerulea* (Yamazaki
249 et al., 1997), *Onchidella celtica* and *Pyramidella dolabrata* (Grande
250 et al., 2008); and one chaetodermomorph, *Scutopus ventrolineatus*
251 (Osca et al., 2014a). Derived amino acid sequences from all 13 mt
252 protein-coding genes were downloaded from GenBank using
253 MitoBank (Abascal et al., 2007). Phylogenetic analyses were con-
254 ducted based on the concatenation of the deduced amino acid
255 sequences of the 13 protein-coding genes (hereafter the mt data
256 set).

257 In addition, a nuclear data set was constructed by retrieving
258 from GenBank the partial nucleotide sequences of the nuclear
259 genes encoding the rRNAs 18S and 28S (segments d1, d4–d5, d6,
260 and B) and the amino acid sequences of the Histone 3 (H3) gene
261 of representatives of the main lineages of caenogastropods
262 (Colgan et al., 2007, 2003, 2000), one neritimorph, two vetigas-
263 tropods, one patellogastropod, and one chaetodermomorph

Please cite this article in press as: Osca, D., et al. Caenogastropod mitogenomics. Mol. Phylogenet. Evol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.011>

4

D. Osca et al. / Molecular Phylogenetics and Evolution xxx (2015) xxx–xxx

(Table 2). In order to minimize missing data, in some cases we had to concatenate sequences from species for which there is strong evidence for the monophyly of the higher taxon rank (Table 2). Finally, we concatenated mt and nuclear sequence data into a single data set, hereafter named the combined data set.

In order to construct the different data sets, deduced amino acid sequences of the 13 protein-coding genes (mt data set) were aligned separately using Translator X (Abascal et al., 2010). For the nuclear data set, the amino acid sequences of the H3 gene and the nucleotide sequences of the ribosomal RNA nuclear genes were aligned separately using Translator X (Abascal et al., 2010) and MAFFT (Katoh et al., 2002), respectively. Ambiguously aligned positions were removed using Gblocks, v.0.19b (Castresana, 2000) under least stringent settings. Finally, the different single alignments were concatenated.

2.4. Phylogenetic analyses

Alignment format conversions were performed using the ALTER webserver (Glez-Peña et al., 2010). Phylogenetic relationships were inferred using maximum likelihood (ML; Felsenstein, 1981) and Bayesian inference (BI; Huelsenbeck and Ronquist, 2001). ML analyses were conducted with RAxML v7.0.4 (Stamatakis, 2006) using the rapid hill-climbing algorithm. BI analyses were conducted using MrBayes v3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) and running four simultaneous Markov chains for 10 million generations, sampling every 1000 generations, and discarding the first 25% generations as burn-in to prevent sampling before reaching

stationarity (as judged by plots of ML scores and low standard deviation of split frequencies). Two independent Bayesian inference runs were performed to increase the chance of adequate mixing of the Markov chains and to increase the chance of detecting failure to converge.

The best partition schemes and best-fit models of substitution for the three data sets were identified using Partition Finder and Partition Finder Protein (Lanfear et al., 2012) with the Akaike information criterion (AIC; Akaike, 1973). For the mt data set the partitions tested were: all genes combined; all genes separated; all genes separated except *nad4/nad4L* and *atp8/atp6*; and genes grouped by subunits i.e., *cox*, *atp*, *nad* and *cob*. For the nuclear data set the three partitions tested were: all fragments combined, all fragments separated, and fragments grouped by gene type i.e., 18S/28S versus H3. The results of Partition Finder are shown in the Appendix. Support for internal branches was evaluated by non-parametric bootstrapping (Felsenstein, 1985) with 1000 replicates (ML) and by Bayesian posterior probabilities (BI). Maximal, high, moderate, and poor support of a node was defined for ML and BI as 100%, 1; >70%, >0.95; between 50–70%, 0.90–0.95; and below 50%, 0.90, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Mitochondrial genome organization and structural features

The complete mt genomes of *C. hidalgoi*, *N. hebraeus*, *C. adansonii*, and *G. echinophora*, and the partial mt genome of *E. spurca* were

Table 2
Nuclear DNA sequences used in the phylogenetic analyses.

Taxon		Nuclear gene fragments					
Lower	Higher	18S	28S_d1	28S_d6	28S_d4-d5	28S_B	H3
Caenogastropoda							
<i>Leptopoma perlicida</i>	Cyclophoroidea	DQ916519	AY296887	DQ916467	AF033758	AF033759	AF033696
–	Ampullarioidea	DQ916521	DQ916572	ASU78643	DQ916509	DQ916455	DQ916445
<i>Bellamya heudi</i>	Viviparoidea	DQ916520	U75863	U82423	AF033724	AH005970	AF033679
<i>Maoricolpus roseus</i>	Cerithioidea	DQ916523	DQ916573	DQ916469	DQ916510	DQ916456	DQ916446
<i>Ifremeria nautilei</i>	Abyssochrysoidea	GQ290545	GQ290527	GQ290564	–	–	GQ290545
<i>Oncomelania hupensis</i>	Rissooidea	DQ916528	AB611785	–	DQ916512	–	–
<i>Tricula</i>	Rissooidea	AF212908	EF394885	–	–	–	JQ082587
<i>Potamopyrgus</i>	Truncatelloidea	JN997449	AB930357	–	–	–	–
<i>Serpulorbis</i>	Vermetoidea	HQ833992	AY296890	DQ916475	AF033784	AF033785	AF033710
<i>Conuber melanostoma</i>	Naticoidae	DQ916533	DQ916580	DQ916580	DQ916515	DQ916463	DQ916452
–	Stromboidea	GU198749	–	AF033787	AF033786	AF033787	AF033711
<i>Sydaphera undulata</i>	Cancellarioidea	HQ833989	AY296901	DQ916489	AF033742	AF033743	AF033688
<i>Cypraea annulus</i>	Cypraeoidea	DQ916532	AY296892	DQ916479	AF033728	AF033729	AF033681
<i>Tonna cerevisina</i>	Tonnoidea	DQ916534	DQ916582	DQ916483	DQ916517	DQ916465	DQ916453
<i>Cabestana spengleri</i>	Tonnoidea	HM486915	AY296893	DQ916482	AF033738	AF033739	AF033686
<i>Ilyanassa obsoleta</i>	Buccinoidea	AY145379	AY145411	AY145411	–	AY145411	–
<i>Nassarius burchardi</i>	Buccinoidea	DQ916536	AY296897	DQ916486	AF033766	AF033767	AF033702
<i>Volutidae</i>	Muricoidea	HQ834042	DQ916584	–	DQ916518	DQ916466	HQ834182
<i>Babylonia areolata</i>	Muricoidea	HQ834021	–	EU399873	–	–	HQ834157
<i>Bolinus brandaris</i>	Muricoidea	DQ279944	DQ279986	DQ279986	–	–	DQ279944
<i>Concholepas concholepas</i>	Muricoidea	HM486913	EU391554	–	–	–	HM486913
<i>Dicathais orbita</i>	Muricoidea	DQ916537	AY296898	DQ916487	AF033746	AF033747	AF033690
<i>Reishia clavigera</i>	Muricoidea	X91979	HE584200	–	–	–	JN413189
<i>Oliva spicata</i>	Olivioidea	L78898	FM999144	–	–	–	–
<i>Rhizoconus miles</i>	Conoidea	DQ916538	AY296900	DQ916490	AF033734	AF033735	DQ916538
<i>Terebra textilis</i>	Conoidea	EU015525	KJ710222	–	–	–	EU015857
<i>Lophiotoma</i>	Conoidea	HQ834048	EU820176	–	–	–	HQ834048
Outgroups							
<i>Nerita atramentosa</i>	Neritoidea	DQ916542	AY296885	DQ916495	AF033764	AF033765	AF033701
<i>Tegula</i>	Trochoidea	GQ160801	HE800729	–	–	–	AY923979
<i>Turbinidae</i>	Trochoidea	AY698071	FR695685	–	–	–	AY923980
<i>Aplysia</i>	Anaspidea	DQ916539	AY296905	U78644	AF033716	AF033717	AF033675
–	Acteonoidea	AY427516	AY427481	FJ917243	–	DQ916566	EF133483
<i>Lottia</i>	Lottioidea	FJ977632	DQ248942	DQ248942	DQ248942	DQ248942	FJ977727
–	Chaetodermomorpha	X91977	AY145397	AY145397	–	–	AY377763

Please cite this article in press as: Osca, D., et al. Caenogastropod mitogenomics. Mol. Phylogenet. Evol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.011>

sequenced and assembled (see Table 1 for genome lengths and the Appendix for the annotations). Like most animal mt genomes (Boore and Brown, 1994), they encode for 13 protein-coding genes, 22 tRNAs, and 2 rRNAs (Fig. 1). The major strand of all the newly sequenced mt genomes encodes for all protein-coding and rRNA genes (Fig. 1). This strand also encodes for *trnD*, *trnV*, *trnL(uag)*, *trnP*, *trnS(uga)*, *trnH*, *trnF*, the cluster KARNI (*trnK*, *trnA*, *trnR*, *trnN*, *trnI*), and *trnS(gcu)*. The minor strand encodes for the cluster MYCWQGE (*trnM*, *trnY*, *trnC*, *trnW*, *trnQ*, *trnG*, *trnE*) (Fig. 1). The *trnT* can be found encoded in any of the strands depending on the species (Fig. 1). The genes *nad4*/ *nad4L* overlapped in all mt genomes (unknown in *E. spurca*). In *C. hidalgovi*, *nad6* and *cob* may overlap or alternatively, *nad6* could end with an incomplete T-- stop codon (but this would require specific cleavage and posterior polyadenylation; see below). Almost all protein-coding genes start their open reading frame with ATG (see Appendix). However, *nad1* starts with ATA in *C. hidalgovi*, *G. echinophora*, *C. adansoni*, and *E. spurca*. In addition, *nad4* and *cox3* start with GTG and ATA, respectively, in *N. hebraeus*. The start codons for *nad4L*, *nad4*, *nad5* and *cox3* could not be determined in *E. spurca*. The most common stop codon is TAA (see Appendix). The stop codon TAG is used in *atp8*, *nad1*, *nad4*, and *cox3* of *C. hidalgovi*, *nad6* and *nad4L* of *N. hebraeus*, *nad1*, *cob*, and *nad4L* of *G. echinophora*, *cox1* and *nad4L* of *C. adansoni*, and *nad1* and *nad2* of *E. spurca* (the stop codons for *cob*, *nad4L*, *nad4*, and *nad5* could not be determined in this species). The genes *atp6*, *cob*, and *nad5* of *C. hidalgovi*, *cox2* of *G. echinophora*, and *nad1*, *nad4*, and *cox3* of *C. adansoni* end

with a single T whereas *nad3* of *N. hebraeus* ends with TA. These incomplete stop codons presumably become functional by subsequent polyadenylation of the transcribed messenger RNAs (Lopez Sanchez et al., 2011). The largest noncoding region was found in all mt genomes upstream to the 5' end of the *cox3* gene (34–249 bp), in a position that has been postulated as candidate to contain the control region in other gastropod mt genomes (Kurabayashi and Ueshima, 2000). This region failed to be amplified in *E. spurca*. A second intergenic region was found downstream the 3' end of the *atp6* gene (7–41 bp).

Gastropod mitochondrial genomes show relatively high rates of gene rearrangement between major lineages (Grande et al., 2008). However, within each major lineage, genome organizations are relatively stable (with rearrangements normally restricted to tRNA genes), and a consensus gene order can be established. The gene orders of the newly sequenced mt genomes were found to conform to the consensus gene order shared by most caenogastropod mt genomes (Fig. 1). This caenogastropod consensus gene order is very similar to the ones reported for vetigastropods (the closest within gastropods to the ancestral mollusc gene order; see Osca et al., 2014a) and neritimorphs. It mainly differs from the latter two in the relative position of the MYCWQGE tRNA cluster and the inversion of a fragment that includes the following genes: *trnF*, *nad5*, *trnH*, *nad4*, *nad4L*, *trnI*, *trnS*, *cob*, *nad6*, *trnP*, *nad1*, *trnL(uag)*, *rrnL*, *trnV*, and *rrnS*. In addition, the relative positions of the *trnD* and *trnN* are also different in vetigastropods (Fig. 1). Within caenogastropods, minor differences with respect to the

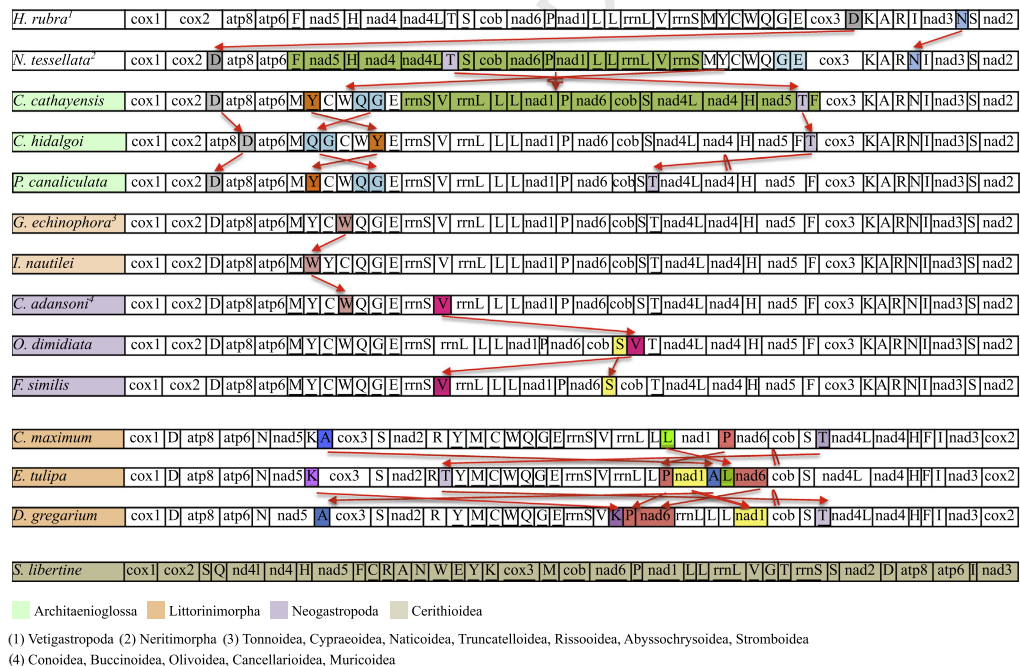


Fig. 1. Mitochondrial gene orders of main lineages of Caenogastropoda. One Neritimorpha (*Neerita tessellata*) and one Vetigastropoda (*Haliotis rubra*) are also shown for comparison. Genes translocated are colored. Inversions (indicated by the circular arrow) and transpositions of protein coding, tRNA and rRNA genes are depicted among the different taxa (except between Cerithioidea and Vermetoidea with respect to other caenogastropod lineages due to the high number of changes). Genes encoded by the minor strand are underlined. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Please cite this article in press as: Osca, D., et al. Caenogastropod mitogenomics. Mol. Phylogenet. Evol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.011>

consensus gene order are found in *C. hidalgoi*, which differs in the relative positions of *trnD*, *trnQ*, *trnG*, *trnY*, and *trnT*; in *Cipangopaludina cathayensis* (Yang et al., 2014) and *Pomacea canaliculata* (Zhou et al., 2014), which differ in the relative position of the *trnT*; in *Ifremeria nautilei* (Osca et al., 2014b), which differs in the relative position of the *trnW*; in *Oxymeris dimidiata* (Dotson and Beard, 2001), which differs in the relative position of the *trnV*; and in *Fusiturris similis* (Cunha et al., 2009), which differs in the relative position of the *trnS* (Fig. 1). However, most conspicuous gene order rearrangements are found in vermetoids (Rawlings et al., 2010) and cerithioids (Zeng et al., 2014). In the former, many genes have changed their relative position, and only the region between *rnl* and *nad4* is relatively stable (Fig. 1). The cluster YMCWQGE is maintained (although the relative position of the genes *trnM* and *trnY* have changed with respect to the consensus gene order) but the cluster KARNI is disintegrated (Fig. 1). The instability of vermetoid mt genomes is high, and the different vermetoid species thus far sequenced show rearrangements between them (Rawlings et al., 2010). The only available mt genome of a cerithioid species, *Semislucospora libertina* (Zeng et al., 2014), shows numerous rearrangements, and even the cluster MYCWQGE is fragmented (Fig. 1).

3.2. Phylogenetic analyses

The molecular phylogeny of Caenogastropoda was reconstructed based on the mt, nuclear, and combined data sets using ML and BI (Figs. 2–4). Several species representing other gastropod lineages (Neritimorpha, Vetigastropoda, Heterobranchia), and a chaetodermomorph, *S. ventrolineatus*, were used as outgroup. After removing ambiguously aligned positions, the final mt amino acid matrix contained 3251 sites. The ML ($-\ln L = 106317.61$) and BI ($-\ln L = 134169.60$ for run1; $-\ln L = 134169.68$ for run2) analyses based on the mt dataset arrived similar tree topologies. All nodes in the BI tree were highly supported whereas several internal nodes in the ML were poorly resolved. Most of the differences between the two trees affected the nodes with low levels of support in the ML phylogeny (Fig. 2). The monophyly of Caenogastropoda received maximal support. The relative phylogenetic position of vermetoids as sister group of the remaining caenogastropods is at odds with morphological evidence, and could be explained due to a long branch attraction (LBA) artifact. As explained above, the vermetoid mt genomes have high rates of gene rearrangement (Rawlings et al., 2010), which are generally associated with high substitution rates (evidenced by the long branches in the reconstructed tree). Hence, their relative position in the mt phylogeny, although highly supported and recovered in previous molecular phylogenetic analyses (Zou et al., 2011), is considered spurious (see Williams et al., 2014) for an even more biased position of vermetoids outside Caenogastropoda based on complete mt genomes). The morphologically, highly derived vermetoids remain as a rather problematic group of uncertain phylogenetic placement. The worm snails were traditionally allied with Cerithioidea (e.g., Houbbrick, 1988), but subsequent studies of sperm ultrastructure rejected this relationship (Healy, 1988). Although their close affinities to cerithioids still persist among some paleontologists (Bandel, 2006; Bandel and Kiel, 2000) and morphologists (Simone, 2011), at present, vermetoids are commonly positioned within the paraphyletic Littorinimorpha (Bouchet and Rocroi, 2005; Ponder et al., 2008; Strong, 2003), their exact placement remaining elusive.

The monophyly of Architaenioglossa was not recovered regardless of the method of inference (Fig. 2). While the two Ampullarioidea were grouped together, the Cyclophoroidea was grouped with the Viviparoidea, against previous analyses strongly grouping Ampullarioidea and Cyclophoroidea (Ponder et al., 2008). In the ML tree, the Cyclophoroidea + Viviparoidea were recovered

as sister group of Ampullarioidea plus Sorbeoconcha (Cerithioidea + Hypsogastropoda, but without vermetoids) with high support. Both, the sister group relationship of Ampullarioidea to Sorbeoconcha (without vermetoids) and the monophyly of the latter were poorly supported (Fig. 2). In the BI tree, the Ampullarioidea were the first lineage branching off (in contradiction with the ML analysis). Next, a clade including the Cyclophoroidea + Viviparoidea and the Cerithioidea was recovered as sister group of the Hypsogastropoda rejecting the monophyly of Sorbeoconcha (regardless of the odd position of vermetoids) (Fig. 2). Architaenioglossa has long been recognized as an assemblage of terrestrial and freshwater lineages forming the earliest two or three branches in the caenogastropod tree (Ponder and Lindberg, 1997). Its potential monophyly has long been questioned due to the absence of well-defined synapomorphies other than the non-marine habitat, and in fact the group is now considered a grade (Ponder et al., 2008). Both morphological (Simone, 2011) and molecular (Colgan et al., 2007; Harasewych et al., 1998; this work) data confirm the non-monophyly of Architaenioglossa, but the relationships of the three superfamilies with each other and with Campaniloidea and Cerithioidea remain controversial. Moreover, in some studies the architaenioglossan superfamilies are recovered as sister group of Campaniloidea (Colgan et al., 2007) or Cerithioidea (this work, but note that we could not include the Campaniloidea in our phylogenetic analyses) also rejecting the monophyly of Sorbeoconcha. In contrast, a Bayesian inference based on a combined morphological and molecular data set recovered Sorbeoconcha as monophyletic with Campaniloidea as sister group of Cerithioidea + Hypsogastropoda (Ponder et al., 2008). In a recent phylogenetic analysis based on transcriptome data, the Ampullarioidea (represented by *Pomacea*) were placed as sister group to monophyletic Sorbeoconcha, and within this latter group, Cerithioidea was recovered as sister group to Hypsogastropoda (Zapata et al., 2014).

The Hypsogastropoda were monophyletic (without taking into account vermetoids) and highly supported in both of our analyses as has often been the case in other molecular phylogenetic analyses (Colgan et al., 2007; Harasewych et al., 1998; McArthur and Harasewych, 2003; Ponder et al., 2008; Zapata et al., 2014). Internal phylogenetic relationships within Hypsogastropoda are difficult to resolve likely due to an early radiation event in the evolutionary history of the group (Colgan et al., 2007). The traditional view of three provisional subgroups i.e., Littorinimorpha, Ptenoglossa, and Neogastropoda (Bouchet and Rocroi, 2005) is contrasted by the most recent division of hypsogastropodan superfamilies into the asiponate and siponate clades (Ponder et al., 2008).

Within Hypsogastropoda, our results show the Abysochrysoidea as sister group of the remaining taxa with poor and maximal support in the ML and BI analyses, respectively (Fig. 2). Previous phylogenetic analyses nested this superfamily within Littorinimorpha (Osca et al., 2014b). A study based on morphology placed Abysochrysoidea as sister group of Littorinidae but without statistical support (Ponder et al., 2008) whereas a molecular phylogeny based on partial mt and nuclear loci recovered Abysochrysoidea in a clade with Cingulopsioidea and Triphoroidea also without statistical support (Takano and Kano, 2014). A previous study based on complete mt genomes but with less number of taxa recovered with high statistical support the Abysochrysoidea right after the branching off of Rissooidea and as sister group of Tonnoidea + Neogastropoda (Osca et al., 2014b).

In the next node of our reconstructed tree, the clade Rissooidea + Truncatelloidea was maximally supported in both ML and BI, and recovered as sister group of Naticicoidea + the siponate clade, although highly supported only in BI. Altogether, the recovered trees failed to support the monophyly of Littorinimorpha (Fig. 2) reinforcing this view of caenogastropod

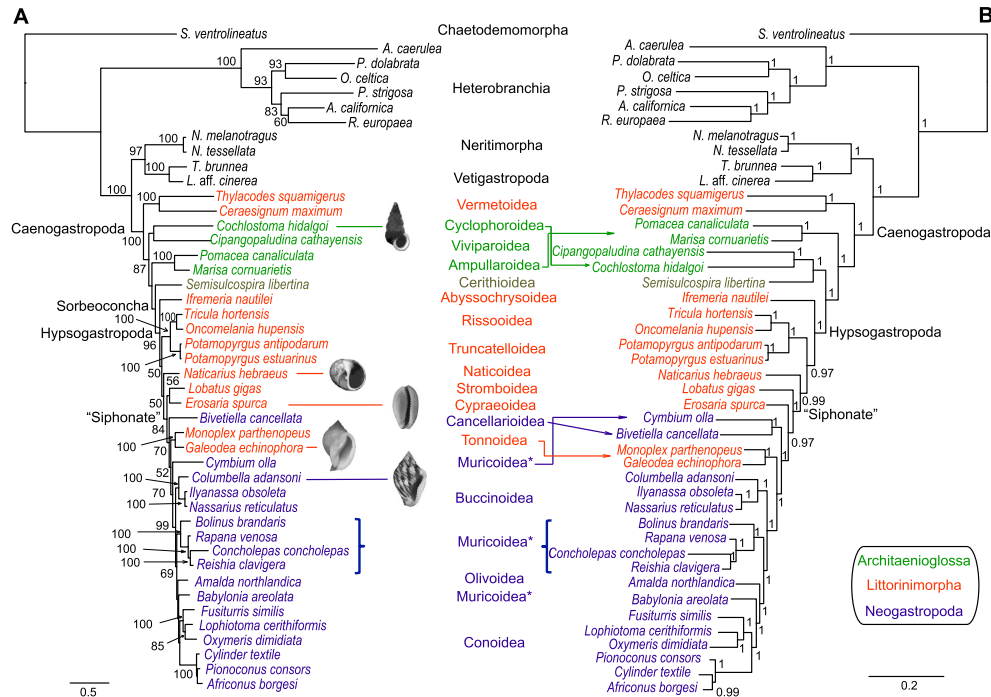


Fig. 2. Phylogenetic relationships of Caenogastropoda based on the mt data set. The ML (A) and BI (B) phylograms are shown. Numbers at nodes are support values from ML (bootstrap proportions) and BI (posterior probabilities). Colors indicate classic higher taxonomic ranks of Caenogastropoda. Superfamilies within Caenogastropoda are indicated (* denotes that Muricoidea is recovered in three independent lineages corresponding to Muricoidea sensu stricto, Muricoidea-Volutidae, and Muricoidea-Babylonidae). Scale bar indicates substitutions/site. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

relationships (Colgan et al., 2007; Osca et al., 2014b; Ponder et al., 2008; Simone, 2011). No mt genome of any member of the Ptenoglossa has been sequenced thus far, and therefore this group could not be included in the present study. The Ptenoglossa, currently confined to Eulimoidea, Epitonioidea (= Janthinoidea) and Triphoroidea, was found to be paraphyletic (Ponder et al., 2008; Ponder and Lindberg, 1997; Takano and Kano, 2014) and treated as an informal group in the working classification by Bouchet and Rocroi (2005). The monophyly of the asiphonate group (Ponder et al., 2008) was also rejected.

The siphonate clade (Ponder et al., 2008) was highly supported in both ML and BI analyses. Members of this clade are characterized by having evolved an anterior siphon, often long and mobile, that greatly increases the osphradial surface, further enhancing the detection at a distance of stimuli (location of predators, food and mates), and allowing discerning the direction from which they are emanating (Lindberg and Ponder, 2001). The ML tree has Stromboidea and Cypraeoidea together with moderate support, and as sister group of the remaining members of the siphonate clade. In the BI tree, Stromboidea is the first lineage branching off, and the Cypraeoidea is recovered as sister group of the remaining members of the siphonate clade with moderate support (Fig. 2). The limpet shaped Calyptraeidae and the tent-shaped Xenophoroidea, which have been previously associated with the siphonate clade (Colgan et al., 2007; Ponder et al., 2008), were not included in the present study since no complete mt genomes are available for these superfamilies.

The monophyly of Neogastropoda is not recovered regardless of the method of inference, unless the littorinimorph Tonnoidea are considered part of the group (Fig. 2). In the ML analysis, the neogastropod Cancellarioidea are recovered as sister group of Tonnoidea and the remaining Neogastropoda, although with low bootstrap support (Fig. 2). While morphological analyses (Ponder et al., 2008; Simone, 2011; Strong, 2003) recover Neogastropoda as a monophyletic group, molecular phylogenies (e.g., Colgan et al., 2007; Cunha et al., 2009; Hayashi, 2005; Williams et al., 2014) normally include tonnoideans within neogastropods (see Zou et al. (2011) for an exception). The early divergence of Cancellarioidea within Neogastropoda was already suggested in some previous morphological (Kantor, 1996) and molecular (Oliverio and Modica, 2010) studies but its position basal to tonnoideans was only noted in previous studies also based on entire mitochondrial genomes (Cunha et al., 2009; Williams et al., 2014). Therefore, there is an open conflict between morphology and molecules on the monophyly of Neogastropoda that awaits the inclusion of more hypsogastropodan lineages in future molecular phylogenies and the analysis of larger sequence data sets.

Current classifications of Neogastropoda generally recognize up to six superfamilies: Buccinoidea, Muricoidea, Olivoidea, Pseudolivoidea, Conoidea, and Cancellarioidea (Bouchet and Rocroi, 2005; WoRMS). Nevertheless, the phylogenetic relationships among neogastropod families remain rather unstable and the monophyly of some of them questionable. In our BI tree, the Cancellarioidea and one neogastropod Muricoidea (*Cymbium olla*,

Please cite this article in press as: Osca, D., et al. Caenogastropod mitogenomics. Mol. Phylogenet. Evol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.011>

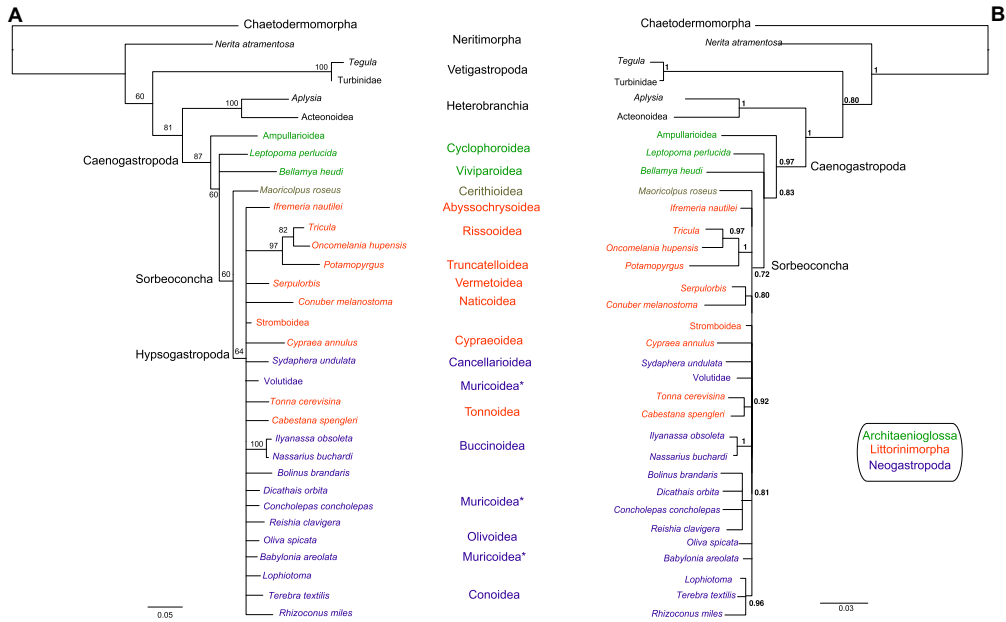


Fig. 3. Phylogenetic relationships of Caenogastropoda based on the nuclear data set. The ML (A: 50% strict consensus) and BI (B: 0.70 strict consensus) phylogenies are shown. Numbers at nodes are support values from ML (bootstrap proportions) and BI (posterior probabilities). Colors indicate classic higher taxonomic ranks of Caenogastropoda. Superfamilies within Caenogastropoda are indicated (* denotes that Muricoidea is recovered in three independent lineages corresponding to Muricoidea *sensu stricto*, Muricoidea–Volutidae, and Muricoidea–Babyloniidae). Scale bar indicates substitutions/site. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Volutidae) are recovered as sister group of Tonnoidea and the remaining Neogastropoda with maximal support (Fig. 2). Within the remaining Neogastropoda, the following lineages branch off successively: Buccinoidea, Muricoidea (except families Volutidae and Babyloniidae), Olividae, Babyloniidae and Conoidea (Fig. 2). The relative positions of the families Babyloniidae and Volutidae in the phylogenies (strongly supported for both in BI; only for Volutidae in ML) reject the monophyly of Muricoidea (Williams et al., 2014), and support the erection of two new superfamilies, Babylonioidae and Volutoidae, respectively. While Babyloniidae is a rather small family with only two genera (*Acinopsis* and *Babylonia*), the family Volutidae is highly diverse with about 40 recognized genera, and thus more data on other species of Volutidae are needed to further delineate this superfamily. A closer phylogenetic relationship of Volutidae (Melo) with Cancellarioidea and Conoidea than with Muricoidea was also obtained based on the entire 18S and partial nuclear H3, and mt *cox1*, *rml*, and *rns* (Zou et al., 2011). The taxonomic classification of Babyloniidae has been controversial. It was traditionally assigned to the superfamily Buccinoidea and, more recently included in Muricoidea (Bouchet and Rocroi, 2005). Phylogenetic analyses support close affinities of *Babylonia* to Volutidae and Olividae (Harasewych and Kantor, 2002) or to Turbinellidae (Zou et al., 2011) based on morphology and molecules, respectively.

The nuclear data set was analyzed at the nucleotide level for the partial 18S and 28S genes, and at the amino acid level for the H3 gene. After removing ambiguously aligned positions, the final matrix contained 1737 sites. The ML ($-\ln L = 7154.50$) and BI ($-\ln L = 7319.54$ for run1; $-\ln L = 7325.52$ for run2) analyses based on the nuclear dataset arrived at similar tree topologies, and

differences were concentrated on deeper nodes with low statistical support (Fig. 3). While the mt-based phylogeny recovered Neritimorpha + Vetigastropoda as sister group of Caenogastropoda (Fig. 2), the nuclear phylogeny placed together Heterobranchia and Caenogastropoda (Fig. 3) in support of the traditional morphological hypothesis termed Apogastropoda (Ponder and Lindberg, 1997; Zapata et al., 2014). This discrepancy may be due to an LBA artifact associated to the long branches exhibited by heterobranch mt genomes (Grande et al., 2008; Stöger and Schrödl, 2013). The monophyly of Caenogastropoda was strongly supported both in ML and BI analyses whereas that of Architaenioglossa was not recovered (Fig. 3). The Ampullarioidea were placed as the sister group of the remaining Caenogastropoda with moderate (ML) to high (BI) statistical support (Fig. 3) in agreement with the BI tree inferred based on the mt data set but against the grouping of Ampullarioidea and Cyclophoroidea reported in previous phylogenetic analyses based on combined morphological and molecular data (Ponder et al., 2008). The monophyly of both Sorbeoconcha and Hypsogastropoda was supported but whether Cyclophoroidea or Viviparoidea are the sister group of Sorbeoconcha was unresolved (Fig. 3). Phylogenetic relationships of major lineages within Hypsogastropoda were largely unresolved (Fig. 3). This is not surprising since the available nuclear markers for the study are known to have relatively slow evolutionary rates, and the diversity of Hypsogastropoda has been proposed to arise from a rapid early radiation after the Permian–Triassic extinction (Colgan et al., 2007). Interestingly, vermetoids were clearly recovered within Hypsogastropoda (Fig. 3), indicating that the reported higher evolutionary rates associated to this group are restricted exclusively to the mt genome (Rawlings et al., 2010).

Please cite this article in press as: Osca, D., et al. Caenogastropod mitogenomics. Mol. Phylogenet. Evol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.011>

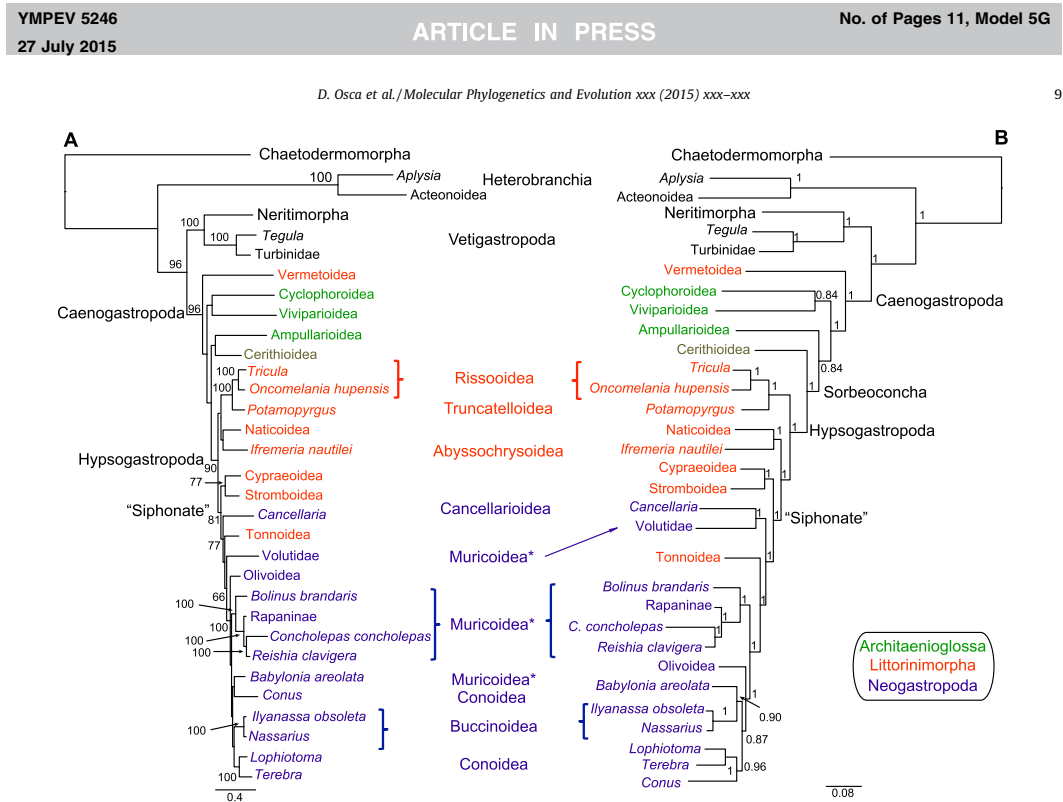


Fig. 4. Phylogenetic relationships of Caenogastropoda based on the combined data set. The ML (A) and BI (B) phylograms are shown. Numbers at nodes are support values from ML (bootstrap proportions) and BI (posterior probabilities). Colors indicate classic higher taxonomic ranks of Caenogastropoda. Superfamilies within Caenogastropoda are indicated (* denotes that Muricoidea is recovered in three independent lineages corresponding to Muricoidea sensu stricto, Muricoidea-Volutidae, and Muricoidea-Babyloniidae). Scale bar indicates substitutions/site. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

After removing ambiguously aligned positions, the final combined matrix contained 5165 (amino acid + nucleotide) sites. The ML ($-\ln L = 87130.89$) and BI ($-\ln L = 108265.42$ for run1; $-\ln L = 108265.64$ for run2) analyses based on the combined data-set arrived at similar tree topologies, and differences were concentrated on deeper nodes with low statistical support (Fig. 4). Overall, the combined tree mostly reflected the mt-based topology and showed similar levels of statistical support of the nodes, and thus of resolution (Fig. 4). The clade Neritimorpha + Vetigastropoda was the sister group of a highly supported Caenogastropoda clade (Fig. 4). Neither Architaenioglossa nor Sorbeoconcha were recovered whereas Hypsogastropoda (without vermetoids, which due to their long branch are recovered as sister group of the remaining caenogastropods) received high statistical support regardless of the method of phylogenetic inference (Fig. 4). Within Hypsogastropoda, the phylogenetic relationships of Abyssochrysoidea, Naticoidae, Rissoidae + Truncatelloidea, and the siphonate clade were unresolved in the ML tree but received maximal support in the BI tree, with Rissoidae + Truncatelloidea as sister group of a clade including Abyssochrysoidea + Naticoidae and the siphonates (Fig. 4). The relative position of Abyssochrysoidea in the combined tree is in agreement with a previous phylogeny based on fewer complete mt genomes (Osca et al., 2014b). Within siphonates, Cypraeoidea + Stromboidea are highly supported as the sister group of the remaining taxa regardless of the method of inference (Colgan et al., 2007; Zou et al., 2011). Cancellarioidea in the ML tree or Cancellarioidea + Volutidae in the BI tree are the next lineages branching off (Fig. 4). The relative

phylogenetic position of Tonnoidea rejects the monophyly of Neogastropoda (Cunha et al., 2009). Phylogenetic relationships among Buccinoidea, Muricoidea (Babyloniidae), Muricoidea (Muricidae), Olividae, and Conoidea were unresolved (Fig. 4). As in the mt tree, the polyphyly of Muricoidea prompts for a major reorganization of this superfamily (Zou et al., 2011).

Overall, our results support the monophyly of Caenogastropoda, Hypsogastropoda (without Vermetoidea), and the siphonate clade. The taxonomic validity of Architaenioglossa (all analyses), Sorbeoconcha (BI with mt data, ML with combined data), Littorinimorpha (all analyses), Neogastropoda (all analyses), and Muricoidea (all analyses) is seriously questioned. According to our results, Architaenioglossa should be considered a grade and paraphyletic with respect to Sorbeoconcha (or Hypsogastropoda depending on whether the monophyly of Sorbeoconcha is confirmed in further phylogenetic analyses). The relative phylogenetic positions of Cyclophoroidea, Ampullarioidea, Viviparioidea, and Cerithioidea remain unresolved (as well as that of Campaniloidea not included in the present phylogenetic analyses). Within Hypsogastropoda, Littorinimorpha should be considered a grade and paraphyletic with respect to Neogastropoda (including Tonnoidea). Other important superfamilies formerly included within Littorinimorpha such as e.g. Calyptraeidae, Littorinoidea, Xenophoroidea, Pterotracheoidea and Capuloidea need to be included in the phylogenetic analyses to further resolve this section of the caenogastropod tree, and to test whether any other of these superfamilies may show closer affinities to Neogastropoda. Moreover, the resolution of the relative phylogenetic position of

Please cite this article in press as: Osca, D., et al. Caenogastropod mitogenomics. Mol. Phylogenet. Evol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.011>

YMPEV 5246
27 July 2015

ARTICLE IN PRESS

No. of Pages 11, Model 5G

10

D. Osca et al. / Molecular Phylogenetics and Evolution xxx (2015) xxx–xxx

the superfamilies Epitonioidae, Eulimoidea, and Triphoroidea (formerly included in Ptenoglossa) also await future inclusion of these taxa in molecular phylogenetic studies. For Neogastropoda, in order to reconcile taxonomy and the molecular phylogeny (if this proofs finally to be correct), the group could be redefined either including Tonnoidea (that would have secondarily lost the synapomorphies of Neogastropoda) or excluding Cancellarioidea and possibly Volutidae, which would indicate that the synapomorphies defining Neogastropoda would be instead homoplasies. In order to resolve the polyphyly of Muricoidea as traditionally defined, we propose to restrict Muricoidea to the family Muricidae and at least erect two new superfamilies Volutoidae and Babylonioidae. The phylogenetic position and taxonomic classification of other muricoid families (e.g. Harpidae, Mitridae, Turbellinellidae) would await further phylogenetic studies.

Acknowledgments

We are indebted to Gilberto Diosdado and Ivan Acevedo for the gift of a specimen of *N. hebraeus* and of *C. adansonii*, respectively. We thank three anonymous reviewers for their insightful comments on a previous version of the manuscript. We are grateful also to Lourdes Alcaraz and Silvia Perea for their help in completing the *C. hidalgoi* mt genome and to Juan Esteban Uribe for helping in the amplification and sequencing of the control region of *C. adansonii*. We are grateful to Jesús Marco and Luis Cabellos who provided access to the supercomputer Altamira at the Institute of Physics of Cantabria (IFCA-CSIC), member of the Spanish Supercomputing Network, for performing phylogenetic analyses. We thank Etienne Kornobis for helping with the assembly programs and introducing us to the Altamira environment. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2010-18216 and CGL2013-45211-C2-2-P to RZ; BES-2008-009562 to DO).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.011>.

References

- Abascal, F., Zardoya, R., Telford, M.J., 2010. TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Res.* 38, W7–W13.
- Akaike, H., 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov, B.N., Csaki, F. (Eds.), 2nd International Symposium on Information Theory. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, pp. 267–281.
- Aktipis, S.W., Giribet, G., 2010. A phylogeny of Vetigastropoda and other “archaeogastropods”: re-organizing old gastropod clades. *Invertebr. Biol.* 129, 220–240.
- Arquez, M., Colgan, D., Castro, L.R., 2014. Sequence and comparison of mitochondrial genomes in the genus *Nerita* (Gastropoda: Neritimorpha: Neritidae) and phylogenetic considerations among gastropods. *Mar. Genom.* 15, 45–54.
- Bandel, K., 1993. Caenogastropoda during Mesozoic times. *Scripta Geol.* 2, 7–56.
- Bandel, K., 2006. Families of the Cerithioidea and related superfamilies (Palaeo-Caenogastropoda; Mollusca) from the Triassic to the Recent characterized by protoconch morphology – including the description of new taxa. *Freib. Forsch. C* 51, 59–138.
- Bandel, K., Kiel, S., 2000. Earliest known (Campanian) members of the Vermetidae, Provannidae and Litiopidae (Cerithioidea, Gastropoda), and a discussion of their possible relationships. *Mitt. Geol. – Paläont. Inst. Univ. Hamburg* 84, 209–218.
- Bandyopadhyay, P.K., Stevenson, B.J., Cady, M.T., Olivera, B.M., Wolstenholme, D.R., 2006. Complete mitochondrial DNA sequence of a Conoidean gastropod, *Lophiotoma* (*Xenoturris*) *cerithiformis*: gene order and gastropod phylogeny. *Toxicon* 48, 29–43.
- Bandyopadhyay, P.K., Stevenson, B.J., Ownby, J.-P., Cady, M.T., Watkins, M., Olivera, B.M., 2008. The mitochondrial genome of *Conus textile*, *coxI*–*coxII* intergenic sequences and Conoidean evolution. *Mol. Phylog. Evol.* 46, 215–223.
- Bernt, M., Bleidorn, C., Braband, A., Dambach, J., Donath, A., Fritzsche, G., Golombek, A., Hadrys, H., Jähling, F., Meusemann, K., Middendorf, M., Misof, B., Perseke, M.,

- Podsiadlowski, L., von Reumont, B., Schierwater, B., Schlegel, M., Schrödl, M., Simon, S., Stadler, P.F., Stöger, I., Struck, T.H., 2013. A comprehensive analysis of bilaterian mitochondrial genomes and phylogeny. *Mol. Phylog. Evol.* 69, 352–364.
- Boore, J., Brown, W., 1994. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the black chiton, *Katharina tunicata*. *Genetics* 138, 423–443.
- Boore, J.L., Brown, W.M., 2000. Mitochondrial genomes of *Galathea*, *Helobdella*, and *Platynereis*: sequence and gene arrangement comparisons indicate that Pogonophora is not a phylum and annelida and arthropoda are not sister taxa. *Mol. Biol. Evol.* 17, 87–106.
- Bouchet, P., Rocroi, J.P., 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia* 47, 397.
- Brauer, A., Kurz, A., Stockwell, T., Baden-Tillson, H., Heidler, J., Wittig, I., Kaufenstein, S., Mebs, D., Stöcklin, R., Remm, M., 2012. The mitochondrial genome of the venomous cone snail *Conus consors*. *PLoS ONE* 7, e51528.
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552.
- Castro, L.R., Colgan, D.J., 2010. The phylogenetic position of Neritimorpha based on the mitochondrial genome of *Nerita melanotragus* (Mollusca: Gastropoda). *Mol. Phylog. Evol.* 57, 918–923.
- Colgan, D.J., Ponder, W.F., Beacham, E., Macaranas, J., 2007. Molecular phylogenetics of Caenogastropoda (Gastropoda: Mollusca). *Mol. Phylog. Evol.* 42, 717–737.
- Colgan, D.J., Ponder, W.F., Beacham, E., Macaranas, J.M., 2003. Gastropod phylogeny based on six segments from four genes representing coding or non-coding and mitochondrial or nuclear DNA. *Molluscan Res.* 23, 123–148.
- Colgan, D.J., Ponder, W.F., Eggleter, P.E., 2000. Gastropod evolutionary rates and phylogenetic relationships assessed using partial 28S rDNA and histone H3 sequences. *Zool. Scr.* 29, 29–63.
- Cox, L.R., 1960. Thoughts on the classification of the Gastropoda. *J. Molluscan Stud.* 33, 239–261.
- Cunha, R., Grande, C., Zardoya, R., 2009. Neogastropod phylogenetic relationships based on entire mitochondrial genomes. *BMC Evol. Biol.* 9, 210.
- Dotson, E.M., Beard, C.B., 2001. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Mol. Biol.* 10, 205–215.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–376.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- Glez-Peña, D., Gómez-Blanco, D., Reboiro-Jato, M., Fdez-Riverola, F., Posada, D., 2010. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Res.* 38, W14–W18.
- Grande, C., Templado, J., Lucas Cervera, J., Zardoya, R., 2002. The complete mitochondrial genome of the nudibranch *Robostra europaea* (Mollusca: Gastropoda) supports the monophyly of opisthobranchs. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1672–1685.
- Grande, C., Templado, J., Zardoya, R., 2008. Evolution of gastropod mitochondrial genome arrangements. *BMC Evol. Biol.* 8, 61.
- Harasewych, M.G., Adamkewicz, S.L., Plassmeyer, M., Gillevet, P.M., 1998. Phylogenetic relationships of the lower Caenogastropoda (Mollusca, Gastropoda, Architaenioglossa, Campanioidae, Cerithioidea) as determined by partial 18S rDNA sequences. *Zool. Scr.* 27, 361–372.
- Harasewych, M.G., Kantor, Y.I., 2002. On the morphology and taxonomic position of *Babylonia* (Neogastropoda: Babyloniidae). *Bollettino Malacologico Suppl.* 4, 19–36.
- Haszprunar, G., 1988. On the origin and evolution of major gastropod groups, with special reference to the Streptoneura. *J. Molluscan Stud.* 54, 367–441.
- Hayashi, S., 2005. The molecular phylogeny of the Buccinidae (Caenogastropoda: Neogastropoda) as inferred from the complete mitochondrial 16S rRNA gene sequences of selected representatives. *Molluscan Res.* 25, 85–98.
- Healy, J.M., 1988. Spermatophyte morphology in *Serpulorhis* and *Dendropoma* and its relevance to the systematic position of the Vermetidae (Gastropoda). *J. Molluscan Stud.* 54, 295–308.
- Houbbrick, R.S., 1988. Cerithioidean phylogeny. *Malacol. Rev. Suppl.* 4, 88–128.
- Huelsenbeck, J., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Kantor, Y., 1996. Phylogeny and relationships of Neogastropoda. In: Taylor, J. (Ed.), *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca*, pp. 221–230.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.I., Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066.
- Ki, J.-S., Lee, Y.-M., Jung, S.-O., Horiguchi, T., Cho, H.-S., Lee, J.-S., 2010. Mitochondrial genome of *Thais clavigera* (Mollusca: Gastropoda): affirmation of the conserved, ancestral gene pattern within the mollusks. *Mol. Phylog. Evol.* 54, 1016–1020.
- Knudsen, B., Kohn, A.B., Nahir, B., McFadden, C.S., Moroz, L.L., 2006. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the sea slug, *Aplysia californica*: conservation of the gene order in Euthyneura. *Mol. Phylog. Evol.* 38, 459–469.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6196–6200.

Please cite this article in press as: Osca, D., et al. Caenogastropod mitogenomics. *Mol. Phylogenet. Evol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.011>

- 822 Kurabayashi, A., Ueshima, R., 2000. Complete sequence of the mitochondrial DNA of
823 the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematic implication of
824 the genome organization. *Mol. Biol. Evol.* 17, 266–277.
- 825 Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: combined
826 selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic
827 analyses. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1695–1701.
- 828 Lindberg, D.R., Ponder, W.F., 2001. The influence of classification on the
829 evolutionary interpretation of structure: a re-evaluation of the evolution of
830 the pallial cavity of gastropod molluscs. *Org. Divers. Evol.* 1, 273–299.
- 831 Lopez Sanchez, M.I.G., Mercer, T.R., Davies, S.M.K., Shearwood, A.-M.J., Nygård,
832 K.K.A., Richman, T.R., Mattick, J.S., Rackham, O., Filipovska, A., 2011. RNA
833 processing in human mitochondria. *Cell Cycle* 10, 2904–2916.
- 834 Márquez, E.J., Castro, E.R., Alzate, J.F., 2014. Mitochondrial genome of the
835 endangered marine gastropod *Strombus gigas* Linnaeus, 1758 (Mollusca:
836 Gastropoda). *Mitochondrial DNA*, 1–2.
- 837 Maynard, B., Kerr, L., McKiernan, J., Jansen, E., Hanna, P., 2005. Mitochondrial DNA
838 sequence and gene organization in the Australian Blacklip Abalone *Haliotis*
839 *rubra* (Leach). *Mar. Biotechnol.* 7, 645–658.
- 840 McArthur, A., Harasewych, M., 2003. Molecular systematics of the major lineages of
841 the Gastropoda. In: Lydeard, C., Lindberg, D.R. (Eds.), *Molecular Systematics and*
842 *Phylogeography of Mollusks*. Smithsonian Books, Washington, DC, pp. 140–160.
- 843 McComish, B.J., Hills, S.F.K., Biggs, P.J., Penny, D., 2010. Index-free de novo assembly
844 and deconvolution of mixed mitochondrial genomes. *Genome Biol. Evol.* 2, 410–
845 424.
- 846 Neiman, M., Hehman, G., Miller, J.T., Logsdon, J.M., Taylor, D.R., 2010. Accelerated
847 mutation accumulation in asexual lineages of a freshwater snail. *Mol. Biol. Evol.*
848 27, 954–963.
- 849 Núñez-Acuña, G., Aguilar-Espinoza, A., Gallardo-Escárate, C., 2013. Complete
850 mitochondrial genome of *Concholepas concholepas* inferred by 454
851 pyrosequencing and mtDNA expression in two mollusc populations. *Comp.*
852 *Biochem. Physiol. D: Genomics Proteomics* 8, 17–23.
- 853 Oliverio, M., Modica, M.V., 2010. Relationships of the haematophagous marine snail
854 *Colubraria* (Rachiglossa: Colubrariidae), within the neogastropod phylogenetic
855 framework. *Zool. J. Linn. Soc.* 158, 779–800.
- 856 Osca, D., Irisarri, I., Todt, C., Grande, C., Zardoya, R., 2014a. The complete
857 mitochondrial genome of *Scutopus ventrolineatus* (Mollusca:
858 Chaetodermomorpha) supports the Aculifera hypothesis. *BMC Evol. Biol.* 14,
859 1–10.
- 860 Osca, D., Templado, J., Zardoya, R., 2014b. The mitochondrial genome of *Ifremeria*
861 *nautilae* and the phylogenetic position of the enigmatic deep-sea
862 *Abyssochrysoidea* (Mollusca: Gastropoda). *Gene* 547, 257–266.
- 863 Palumbi, S., Martin, A., McMillan, W., Stice, L., Grabowski, G., 1991. The simple fool's
864 guide to PCR. <<http://palumbi.stanford.edu/SimpleFoolsMaster.pdf>>, pp. 1–45.
- 865 Ponder, W.F., Colgan, D.J., Healy, J.M., Nützel, A., Simone, L.R.L., Strong, E.E., 2008.
866 *Caenogastropoda*. In: Ponder, W.F., Lindberg, D.L. (Eds.), *Molluscan Phylogeny*
867 *and Evolution*. University of California Press, Berkeley, pp. 331–383.
- 868 Ponder, W.F., Lindberg, D.R., 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an
869 analysis using morphological characters. *Zool. J. Linn. Soc.* 119, 83–265.
- 870 Rawlings, T., MacInnis, M., Bieler, R., Boore, J., Collins, T., 2010. Sessile snails,
871 dynamic genomes: gene rearrangements within the mitochondrial genome of a
872 family of caenogastropod molluscs. *BMC Genomics* 11, 440.
- 873 Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference
874 under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- 875 San Mauro, D., Gower, D.J., Müller, H., Loader, S.P., Zardoya, R., Nussbaum, R.A.,
876 Wilkinson, M., 2014. Life-history evolution and mitogenomic phylogeny of
877 caecilian amphibians. *Mol. Phylog. Evol.* 73, 177–189.
- 878 Shao, Z., Graf, S., Chaga, O.Y., Lavrov, D.V., 2006. Mitochondrial genome of the moon
879 jelly *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa): a linear DNA molecule encoding a
880 putative DNA-dependent DNA polymerase. *Gene* 381, 92–101.
- 881 Sigwart, J.D., Lindberg, D.R., 2014. Consensus and confusion in molluscan trees:
882 evaluating morphological and molecular phylogenies. *Syst. Biol. Epub, Dec2*.
- 883 Simonsen, W., Lindberg, D., Boore, J., 2006. Rolling circle amplification of metazoan
884 mitochondrial genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 562–567.
- 885 Simone, L.R.L., 2011. Phylogeny of the Caenogastropoda (Mollusca), based on
886 comparative morphology. *Arquivos de Zoologia* 42, 161–323.
- 887 Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic
888 analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–
889 2690.
- 890 Stöger, I., Schrödl, M., 2013. Mitogenomics does not resolve deep molluscan
891 relationships (yet?). *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 376–392.
- 892 Strong, E.E., 2003. Refining molluscan characters: morphology, character coding and
893 a phylogeny of the Caenogastropoda. *Zool. J. Linn. Soc.* 137, 447–554.
- 894 Takano, T., Kano, Y., 2014. Molecular phylogenetic investigations of the
895 relationships of the echinoderm-parasite family Eulimidae within
896 Hypsogastropoda (Mollusca). *Mol. Phylogenet. Evol.* 79, 258–269.
- 897 Thiele, J., 1929. *Handbuch der Systematischen Weichtierkunde*. Gustav Fischer,
898 Jena.
- 899 Vermeij, G.J., 2007. The ecology of invasion: acquisition and loss of the siphonal
900 canal in gastropods. *Palaeobiol.* 33, 469–493.
- 901 Wang, M., Qiu, J.-W., 2014. Complete mitochondrial genome of the giant ramshorn
902 snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Ampullariidae). *Mitochondrial DNA*, 1–2.
- 903 Williams, S.T., Foster, P.C., Littlewood, D.T.J., 2014. The complete mitochondrial
904 genome of a turbinid vetigastropod from MiSeq Illumina sequencing of genomic
905 DNA and steps towards a resolved gastropod phylogeny. *Gene* 533, 38–47.
- 906 Yamazaki, N., Ueshima, R., Terrett, J.A., Yokobori, S., Kaifu, M., Segawa, R., Kobayashi,
907 T., Numachi, K., Ueda, T., Nishikawa, K., Watanabe, K., Thomas, R.H., 1997.
908 Evolution of pulmonate gastropod mitochondrial genomes: comparisons of
909 gene organizations of *Euhadra*, *Cepaea* and *Albinaria* and implications of unusual
910 tRNA secondary structures. *Genetics* 145, 749–758.
- 911 Yang, H., Zhang, J.-E., Luo, H., Luo, M., Guo, J., Deng, Z., Zhao, B., 2014. The complete
912 mitochondrial genome of the mudsnail *Cingulopaludina cathayensis*
913 (Gastropoda: Viviparidae). *Mitochondrial DNA*, 1–3.
- 914 Zapata, F., Wilson, N.G., Howison, M., Andrade, S.C.S., Jörgen, K.M., Schrödl, M.,
915 Goetz, F.E., Giribet, G., Dunn, C.W., 2014. Phylogenomic analyses of deep
916 gastropod relationships reject Orthogastropoda. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.*
917 281.
- 918 Zeng, T., Yin, W., Xia, R., Fu, C., Jin, B., 2014. Complete mitochondrial genome of a
919 freshwater snail, *Semisulcospira libertina* (Cerithioidea: Semisulcospiridae).
920 *Mitochondrial DNA*, 1–2.
- 921 Zhou, X., Chen, Y., Zhu, S., Xu, H., Liu, Y., Chen, L., 2014. The complete mitochondrial
922 genome of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Mitochondrial*
923 *DNA*, 1–2.
- 924 Zou, S., Li, Q., Kong, L., 2011. Additional gene data and increased sampling give new
925 insights into the phylogenetic relationships of Neogastropoda, within the
926 caenogastropod phylogenetic framework. *Mol. Phylog. Evol.* 61, 425–435.
- 927



4. Discusión

4. DISCUSIÓN

4.1 EVOLUCIÓN DEL ORDENAMIENTO DEL GENOMA MITOCONDRIAL EN MOLLUSCA, GASTROPODA Y CAENOGASTROPODA

4.1.1 REORDENAMIENTOS EN EL GENOMA MITOCONDRIAL DE LOS MOLLUSCA

El ordenamiento del genoma mitocondrial de *Scutopus ventrolineatus*, representante de los Aplacóforos, uno de los linajes que primero divergió en el árbol filogenético de los moluscos, se ha comparado en esta tesis con el conocido en otros moluscos y ha resultado muy similar al de los Poliplacóforos, Cefalópodos y a los linajes basales de los Gasterópodos (Vetigastropoda y Neritimorpha; pero no al de Patellogastropoda). No se han hallado diferencias en la posición relativa de los genes codificantes de proteínas. Sin embargo, el gen *rrnL* en *S. ventrolineatus* sí está desplazado con respecto a los grupos de moluscos mencionados anteriormente. Otras diferencias encontradas consisten en la posición relativa de varios genes codificantes de tRNAs; en particular, los genes *trnD*, *trnE* y *trnN* varían considerablemente su posición entre los diferentes linajes de moluscos. Por otro lado, se ha comparado el orden génico de *S. ventrolineatus* con el que presenta *Solemya velum*, representante de uno de los linajes (Solemyoidea) que primero divergió en el árbol de la clase Bivalvia. Esta última especie también retiene el mismo orden génico, aunque con una larga transversión que afecta a los genes *atp8-atp6-nad5-nad4-nad4L* (Fig. 2, Capítulo 3.1). Otros bivalvos de linajes más derivados presentan ordenamientos génicos muy distintos al consenso de moluscos (además del problema de la existencia de un genoma mitocondrial heredado por vía parental). En los escafópodos, el orden génico mitocondrial es bastante diferente al que presentan los demás moluscos, tanto en *Graptacme* (Fig. 2, Capítulo 3.1) como en *Siphonodentalium* (Stöger et al., 2013). En *Graptacme*, solo se conservan los bloques *nad6-trnP-nad1* y *nad5-nad4-nad4L*, mientras que pares de genes adyacentes como *cox1-cox2* o *atp8-atp6*, que

tradicionalmente se mantienen en otros genomas mitocondriales de metazoos, aquí no se encuentran. Es necesario conocer nuevos genomas mitocondriales de los linajes que primero divergieron en Scaphopoda para poder determinar cuando los escafópodos perdieron el ordenamiento génico ancestral de los moluscos.

Ha resultado llamativo, a su vez, que el genoma mitocondrial de *Chaetoderma nitidulum*, otro caudofoveado (cuyo genoma no ha sido publicado, pero al que se tiene acceso en GenBank), presenta un tamaño un 40% mayor (21.008 pb) que el de *S. ventrolineatus*, muestra una duplicación del gen *cox2*, y grandes regiones no codificantes. (Fig. 1, Apéndice Capítulo 7.1). Además, tiene múltiples genes codificantes de tRNAs reordenados (*trnV*, *trnF*, *trnG*, *trnW*, *trnA*, *trnR*, *trnI*, *trnS* (UCN); y *trnV* y *trnS* (UCN)), encontrándose muchos de ellos codificados en cadenas opuestas si lo comparamos con *S. ventrolineatus*. Puesto que el ordenamiento que presenta esta última especie coincide con el que se presupone que es ancestral en los moluscos, sería importante determinar cuál es el origen de la gran divergencia del genoma de *C. nitidulum* y descartar posibles errores de secuenciación o anotación en esta especie.

Por otro lado, tras comparar con el orden génico conocido en representantes de otros grupos de Trochozoa (Nemertinos, Braquiópodos y Foronídeos) y de un grupo de Spiralia no Trochozoa (Endoproctos), se propone en la presente tesis el posible “orden génico de consenso” de los genes mitocondriales codificantes de proteínas y de los dos genes codificantes de rRNAs para el molusco ancestral hipotético (Fig. 2, Capítulo 3.1). Tan solo serían necesarias unas pocas translocaciones y transversiones con respecto a este orden génico hipotético para obtener los ordenamientos observados en otros Spiralia.

4.1.2 REORDENAMIENTOS DEL GENOMA MITOCONDRIAL DE LOS GASTROPODA

Se ha comprobado que la organización de los genes en los gasterópodos es propensa a reordenamientos entre los principales linajes, pero relativamente estable dentro de cada uno de ellos, restringiéndose los cambios a los genes codificantes de tRNAs (Grande *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2009). La única posible excepción sería el caso de Patellogastropoda. Así, en general, el ordenamiento génico se puede utilizar como una primera aproximación para seleccionar a cuál de los principales linajes pertenece cualquier gasterópodo (Cunha *et al.*, 2009), excepto para Patellogastropoda.

El orden génico obtenido en los nuevos mitogenomas de gasterópodos secuenciados en esta tesis es equiparable, como era de esperar, al compartido por la mayoría de Caenogastropoda (Fig. 1, Capítulo 3.3), ya que las especies analizadas pertenecen a este linaje. Con respecto al orden génico conocido para los vetigasterópodos (que son el linaje de gasterópodos que conserva el ordenamiento más próximo al propuesto para el posible molusco ancestral), los nuevos genomas mitocondriales secuenciados difieren en la posición relativa del grupo MYCWQGE de tRNAs y en la inversión de un fragmento que incluye varios genes: *trnF*, *nad5*, *trnH*, *nad4*, *nad4L*, *trnT*, *trnS*, *cob*, *nad6*, *trnP*, *nad1*, *trnL(uaa)*, *trnL(uag)*, *rrnL*, *trnV* y *rrnS* (Fig. 1, Capítulo 3.3).

La posición ancestral del gen *trnW* en los gasterópodos se sitúa entre los genes *trnY* y *trnQ*, como sucede también en algunos cefalópodos (Yokobori *et al.*, 2004), poliplacóforos (Boore y Brown, 1994) y algunos bivalvos (Plazzi *et al.*, 2013). Dentro de los gasterópodos, Vetigastropoda, Neritimorpha y Caenogastropoda tienen el gen *trnC*, normalmente, entre los genes *trnY* y *trnW*. Por tanto, la posición relativa del gen *trnC* podría ser considerada una sinapomorfía molecular del ancestro común de estos tres grupos, como sugieren Castro y Colgan (2010) (Fig. 2, Capítulo 3.2).

4.1.3 REORDENAMIENTO DEL GENOMA MITOCONDRIAL EN LOS CAENOGASTROPODA

Ifremeria nautilei (capítulo 3.2) representa a la única superfamilia de Caenogastropoda endémica de los hábitats quimioautótrofos. El orden génico obtenido para el genoma mitocondrial de esta especie se asimila, entre otros, al de *Oncomelania hupensis* (Rissooidea), *Monoplex parthenopeum* (Tonnoidea) y *Bolinus brandaris* (Muricoidea), que solo difieren, con respecto al de *I. nautilei*, en la posición relativa del gen *trnW* (en *I. nautilei* se encuentra entre los genes *trnM* y *trnY*, y en las otras especies entre los genes *trnC* y *trnQ*; Fig. 2, Capítulo 3.2). El gen *trnW* también comparte la posición encontrada en *I. nautilei* con el género *Alviniconcha*, pero no con otros Aabysochrysoidea, que muestran el típico ordenamiento de Caenogastropoda (Hidaka *et al.*, 2012). Por tanto, la transposición del *trnW* seguramente ocurrió en el ancestro común de *Ifremeria* y *Alviniconcha* (Hidaka *et al.*, 2012). Ello apoya las conclusiones de Johnson *et al.* (2010), en cuya filogenia ambos géneros forman un clado independiente del resto de Aabysochrysoidea. *Ifremeria* y *Alviniconcha* son exclusivos de las fuentes hidrotermales profundas y los únicos dentro de la superfamilia que poseen bacterias quimiosimbiontes.

Si se comparan los órdenes génicos de los mitogenomas de los demás cenogasterópodos secuenciados (capítulo 3.3) con el típico de los cenogasterópodos, las diferencias son mínimas y restringidas a genes codificantes de tRNAs (Fig. 1, Capítulo 3.3). Sin embargo, los cambios más considerables se han detectado en Vermetoidea (Rawlings *et al.*, 2010) y Cerithioidea (Zeng *et al.*, 2014). En los representantes de vermetoideos cuyo genoma mitocondrial se conoce, muchos genes han cambiado su posición relativa y solo la región *rrnL* y *nad4* se mantiene relativamente estable (Fig. 1, Capítulo 3.3). El único genoma mitocondrial de Cerithioidea disponible es el de *Semisulcospira libertina* (Zeng *et al.*, 2014), que muestra numerosos reordenamientos, careciendo incluso del grupo MYCWQGE (Fig. 1, Capítulo 3.3). Sería necesario disponer de mitogenomas de más representantes de

Cerithioidea, ya que se trata de una superfamilia extraordinariamente diversificada y con múltiples invasiones del medio dulceacuícola.

4.2 RELACIONES FILOGENÉTICAS DE MOLLUSCA, GASTROPODA Y CAENOASTROPODA

Reconstruir la monofilia y las relaciones filogenéticas internas de los moluscos basándose en datos moleculares ha sido y sigue siendo un desafío sin resolver. Los primeros estudios se basaban mayoritariamente en secuencias parciales de genes que, vistos con perspectiva, no tenían información suficiente para reconstruir árboles robustos y resueltos (ver Passamanek *et al.*, 2004). Estudios filogenómicos recientes (Kocot *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011) basados en genes nucleares concatenados han producido árboles bien resueltos. Sin embargo, la comparación de dichos árboles muestra contradicciones, que paradójicamente presentan altos soportes estadísticos. Una alternativa es investigar la información filogenética independiente contenida en los genomas mitocondriales completos. Un primer intento basado en ello para indagar la posición filogenética de los moluscos dentro de Bilateria no obtuvo un resultado satisfactorio (Stöger *et al.*, 2013). Los análisis filogenéticos obtenidos en dicho trabajo revelan que el uso de genomas mitocondriales para reconstruir las relaciones filogenéticas internas de los moluscos presenta deficiencias, debido a una alta heterogeneidad de las tasas de evolución entre linajes, la presencia de reordenamientos que producen sesgos en la composición nucleotídica y los fenómenos de saturación debidos a las altas divergencias entre los principales linajes de moluscos.

Los resultados de la presente tesis indican que los genomas mitocondriales de Bivalvia y de *Lottia* (Patellogastropoda) introducen un sesgo en la reconstrucción filogenética, debido a la atracción de ramas largas. Después de eliminar esos taxones en los análisis filogenéticos, los datos mitocondriales fueron capaces de recuperar la

monofilia de Aculifera y Conchifera, de la misma forma que con el análisis nuclear (que, además, recuperó la monofilia de Aplacophora). Además, los análisis filogenéticos realizados muestran que la combinación de datos mitocondriales y nucleares mejoran la resolución del árbol de los moluscos.

Para mejorar los resultados, sería necesario completar los genomas mitocondriales de las clases Neomeniomorpha y Monoplacophora. Además, sería necesario conocer más mitogenomas de Scaphopoda, Bivalvia y Patellogastropoda, para comprobar si contienen representantes con bajas tasas de sustitución que eviten los efectos de atracción de ramas largas.

4.2.1 FILOGENIA DE LOS MOLLUSCA

Tanto los datos morfoanatómicos como los moleculares apoyan la monofilia del phylum Mollusca, así como la de sus ocho clases con representantes vivos. Los moluscos surgieron al final del Precámbrico, con una rápida divergencia de sus distintas clases ya en el Cámbrico (Vinther, 2015). Esta radiación tan temprana, así como la existencia de eslabones extintos, oscurecen las relaciones filogenéticas entre las ocho clases con representantes actuales (Haszprunar y Wanninger, 2012), que siguen siendo objeto de un intenso debate todavía sin resolver (ver Haszprunar *et al.*, 2008; Wägele *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2010; Kocot *et al.*, 2011; Telford y Budd, 2011; Stöger *et al.*, 2013; Schrödl y Stöger, 2014, entre otros) y que es conocido como el “molluscan chaos” (Telford y Budd, 2011; Haszprunar y Wanninger, 2012).

Tradicionalmente se han reconocido diversas agrupaciones alternativas dentro de los moluscos. La más extendida es la que considera dos grandes grupos: Aculifera, por un lado, que reuniría a Aplacophora (Solenogastres y Caudofoveata) y Polyplacophora, y Conchifera, que agruparía al resto de las clases. Otra división alternativa considera Aplacophora (moluscos vermiformes sin concha), por un lado, y Testaria (moluscos con concha), por otro (Salvini-Plawen y Steiner, 1996; Haszprunar,

2000; Salvini-Plawen, 2006; Haszprunar y Ruthensteiner, 2013). Esta propuesta considera la morfología simple de los aplacóforos como la ancestral de los moluscos y normalmente plantea una posible parafilia de este grupo (los aplacóforos serían un grado basal), con los poliplacóforos como grupo intermedio con el resto de Testaria (Conchifera). Sin embargo, el registro fósil no corrobora este planteamiento, ya que el origen de los grupos de Conchifera se ha datado en el Cámbrico Inferior, mientras que los poliplacóforos aparecen en el Cámbrico Superior (Vinther, 2015). Otros autores contemplan la posibilidad de que los aplacóforos hayan derivado de un antecesor poliplacóforo por la pérdida secundaria del pie y las placas dorsales (Scheltema, 1993; Scheltema e Ivanov, 2002; Vinther *et al.*, 2012).

Una nueva hipótesis alternativa a las anteriores fue propuesta por Giribet *et al.* (2006), en cuyo análisis filogenético, basado en secuencias de cinco genes y 108 especies, obtuvieron una estrecha relación entre los poliplacóforos y los monoplacóforos, un clado que denominaron Serialia. Esta propuesta fue duramente criticada (Haszprunar, 2008; Wägele *et al.*, 2009), ya que, además, el análisis de Giribet *et al.* (2006) daba lugar a otros resultados sorprendentes, como la polifilia de los gasterópodos y bivalvos y establecía una relación extraña de grupo hermano entre los caudofoveados y los cefalópodos. Curiosamente, otros autores también han recuperado posteriormente el clado Serialia en sus respectivos análisis (Meyer *et al.*, 2010; Kano *et al.*, 2012; Stöger *et al.*, 2013).

El análisis filogenético obtenido en el capítulo 3.1 de la presente tesis, basado en la secuencia del genoma mitocondrial de 14 especies de moluscos representantes de cinco de las ocho clases (no se conoce el mitogenoma de ningún solenogastro ni de ningún monoplacóforo y los de Bivalvia se excluyeron por dar lugar a ramas largas), apoya la monofilia de Aculifera y Conchifera, pero sería necesario disponer de representantes adecuados de las clases que faltan. Los análisis filogenéticos publicados simultáneamente por Kocot *et al.* (2011) y Smith *et al.* (2011), basados en

genes nucleares concatenados, apoyan también la monofilia de Aculifera y Conchifera, división que había sido propuesta anteriormente desde el punto de vista morfológico (p. ej., Nielsen, 2012). Ambos trabajos moleculares antes citados apoyan también la monofilia de Aplacophora, pero difieren en las relaciones internas obtenidas para Conchifera. Kocot *et al.* (2011) obtienen una estrecha (y sorprendente) relación entre Bivalvia y Gastropoda, mientras que Scaphopoda se sitúa como grupo hermano de este clado, lo cual también es apoyado por el análisis de Vinther *et al.* (2012). A diferencia de Kocot *et al.* (2011), el estudio de Smith *et al.* (2011) incluye a Monoplacophora, que se sitúa como grupo hermano de Cephalopoda en el árbol, mientras Scaphopoda aparece como grupo hermano de Gastropoda.

De todo lo anterior, se observa que la posición de los escafópodos varía mucho en los diferentes análisis. Tradicionalmente, este grupo se asociaba a los bivalvos (conformando el clado denominado Diasoma), argumentando que Rostroconchia (grupo fósil) comparte características intermedias entre ambos grupos (Runnegar y Pojeta, 1974). Esta relación entre Scaphopoda y Bivalvia es apoyada por Smith *et al.* (2012) en una corrección a un artículo anterior (Smith *et al.*, 2011) en el que estos mismos autores recuperaban a Scaphopoda como grupo hermano de Gastropoda. Por su parte, en el análisis molecular de Giribet *et al.* (2006) Scaphopoda resulta más relacionado con Cephalopoda.

En una nueva reinterpretación de la filogenia de los moluscos basada en un amplio análisis multiloci, Stöger *et al.* (2013) obtienen una dicotomía basal de los moluscos (ver Figura 4.1 inferior) en dos grandes clados. El primero incluye a Gastropoda como grupo hermano de Bivalvia y Serialia (Monoplacophora + Polyplacophora), denominado por estos autores “Dorsoconcha”. El segundo clado sitúa a Scaphopoda como grupo hermano de Aplacophora (Caudofoveata + Solenogastres) y Cephalopoda, y fue denominado “Variopoda”.

Todo lo anteriormente expuesto ejemplifica la controversia todavía sin resolver sobre las relaciones internas del filo Mollusca, aderezada por el rico y también controvertido registro fósil. Como resumen, Schrödl y Stöger (2014) ofrecen un análisis crítico de todo este enredo filogenético, señalando las lagunas existentes y los problemas derivados de las diferentes metodologías. Dichos autores (Stöger y Schrödl, 2013; Schrödl y Stöger, 2014) critican el uso de los genomas mitocondriales completos para dilucidar las relaciones entre las distintas clases de moluscos, debido a que las diferentes reorganizaciones, tasas evolutivas y cambios en la composición nucleotídica oscurecen la “señal filogenética”, mientras que indican que son de gran utilidad en grupos a niveles taxonómicos inferiores (es decir dentro de cada clase, a nivel de superfamilia y orden) con secuencias estables y conservadas.

Como resumen de lo anterior, en la figura 4.1 se muestran algunas de las alternativas propuestas, con las distintas denominaciones asignadas a las diferentes agrupaciones obtenidas más habitualmente dentro del phylum Mollusca.

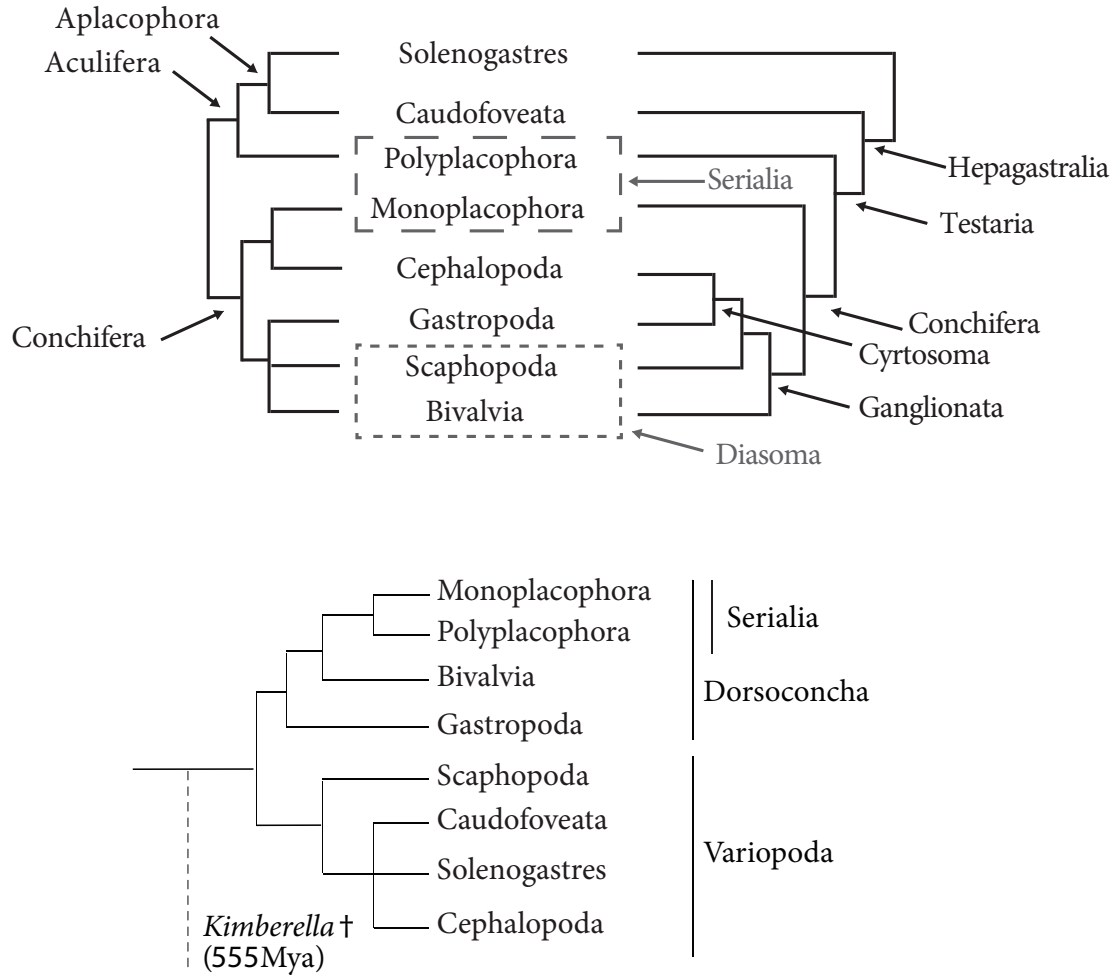


FIGURA 4.1 DIFERENTES HIPÓTESIS SOBRE LA FILOGENIA DE LOS MOLUSCOS. ARRIBA A LA IZQUIERDA, LAS RECIENTES PROPUESTAS DE TELFORD Y BUDD (2011) Y KOCOT (2013), CON LA SEPARACIÓN BASAL DE ACULIFERA Y CONCHIFERA. ARRIBA A LA DERECHA, EL CLÁSICO ÁRBOL MORFO-CLADÍSTICO (HASZPRUNAR, 2000) CON UNA POSICIÓN BASAL DE LOS APLACOPHORA (PARAFILÉTICOS) Y LOS TESTARIA Y CONCHIFERA MONOFILÉTICOS. LOS SERIALIA (MONOPLACOPHORA + POLYPLACOPHORA) SERÍAN INCOMPATIBLES CON AMBAS HIPÓTEISIS. DEBAJO, LA PROPUESTA DE STÖGER ET AL. (2013) QUE APOYA EL CLADO SERIALIA Y CON UNA DIVISIÓN BASAL EN DOS GRANDES GRUPOS, QUE DENOMINAN DORSOCONCHA Y VARIOPODA. FIGURA SUPERIOR TOMADA DE SCHRÖDL Y STÖGER (2014) E INFERIOR MODIFICADA DE STÖGER ET AL. (2013).

En cualquier caso, el número de genomas mitocondriales completos conocidos los moluscos es todavía muy escaso (teniendo en cuenta la extraordinaria diversidad del filo), sobre todo de representantes de las denominadas “clases menores”, o falta por completo en representantes de dos de ellas, Monoplacophora y Solenogastres. Además, sería necesario conocer la evolución del genoma mitocondrial a nivel de organización y secuencia dentro de cada clase para seleccionar aquellos menos divergentes y así poder dilucidar las relaciones entre clases, evitando en lo posible los problemas de atracción de ramas largas. Si utilizamos el grado de reordenamiento genómico como aproximación de la tasa evolutiva de los diferentes genomas mitocondriales, en Gastropoda se concluye que Vetigastropoda, Neritimorpha y Caenogastropoda mantienen un mitogenoma conservado (y por lo tanto ramas más cortas en los análisis filogenéticos), mientras que en Patellogastropoda y Heterobranchia ha sufrido importantes reordenamientos (y por tanto están asociados a ramas largas). Asimismo, dentro de Caenogastropoda, los Vermetoidea y los Cerithioidea, han sufrido también notables reordenamientos con respecto al genoma original del grupo. Por ello, se sugiere excluirlos de los análisis filogenéticos a falta de encontrar posibles genomas menos reorganizados dentro de estos grupos. Entre los bivalvos se sugiere utilizar el mitogenoma de Solemyidae (grupo menos divergente) hasta encontrar una opción mejor. En cualquier caso, no se pueden utilizar otras muchas familias (por ejemplo, Donacidae, Hyriidae, Margaritiferidae, Mytilidae, Solenidae, Unionidae o Veneridae) ya que presentan una herencia parental doble del genoma mitocondrial (Breton *et al.*, 2007), lo que produce, entre otros, problemas adicionales de ortología. Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, el mitogenoma conocido en Scaphopoda (dos especies) muestra importantes reorganizaciones con respecto al original de los moluscos aquí propuesto, lo que origina que su posición filogenética resulte muy variable entre los diferentes esquemas filogenéticos propuestos. Por tanto, se considera necesario ampliar la representación

de miembros de esta clase y encontrar, si es posible, un genoma mitocondrial menos reorganizado.

Partiendo de estas limitaciones referentes al uso del genoma mitocondrial, en la presente tesis se ha optado también por hacer un análisis combinado con los datos mitocondriales y con secuencias conocidas de genes nucleares (capítulo 3.1). Se seleccionaron así fragmentos de genes nucleares de matrices existentes que minimizaran la cantidad de omisiones (“missing data”) pero maximizaran el tamaño muestral necesario para este estudio. El árbol filogenético resultante de este análisis combinado ofrece resultados más congruentes y robustos que los obtenidos con los datos del mitogenoma o con los nucleares por separado. Como resultado del análisis combinado se recupera la monofilia de Aplacophora, Aculifera y Conchifera (tanto usando el método de “máxima verosimilitud” – en adelante ML– como de “inferencia bayesiana” – en adelante BI –) y, dentro de estos últimos, a Cephalopoda como grupo hermano de un clado formado por Gastropoda y Bivalvia + Scaphopoda (solo mediante ML, pues mediante BI los Bivalvia quedaban como linaje anidado dentro de Gastropoda). Estos resultados serían congruentes con los obtenidos por Kocot *et al.* (2011) y Smith *et al.* (2011) respecto a la división Aculifera/Conchifera y a la posición basal de Cephalopoda en los Conchifera, pero difieren de éstos en la relación entre Bivalvia, Scaphopoda y Gastropoda, que en nuestro caso coincide con la propuesta original de Runnegar y Pojeta (1974) y con el árbol morfocladista de Haszprunar (2000), validando el clado Diasoma (Bivalvia + Scaphopoda), también apoyado por Haszprunar *et al.* (2008).

En definitiva, y de acuerdo con Schrödl y Stöger (2014), para resolver la filogenia de los moluscos es necesaria una aproximación integral que combine los datos moleculares nucleares y mitocondriales y que tenga en cuenta también las evidencias fósiles y morfoanatómicas.

4.2.2 FILOGENIA DE LOS GASTROPODA

Las relaciones de los gasterópodos se analizaron en el capítulo 3.2 también a partir de una matriz de datos mitocondriales, de otra con datos nucleares y de una tercera con datos mitocondriales y nucleares combinados. *Scutopus ventrolineatus* fue utilizado como grupo externo, ya que en el capítulo 3.1 se había observado previamente que el mitogenoma de este caudofoveado era próximo al propuesto para el gasterópodo ancestral, por un lado, y también al de Vetigastropoda, Neritimorpha y Caenogastropoda, representando una opción interesante como taxón para el grupo externo en lugar de otros comúnmente utilizados previamente (por ejemplo, cefalópodos). En el caso de los datos exclusivamente mitocondriales, el árbol resultante recuperó dos clados con un alto soporte: 1) Patellogastropoda + Heterobranchia y 2) Vetigastropoda como grupo hermano de Neritimorpha + Caenogastropoda (Fig. 3, Capítulo 3.2). La posición de Patellogastropoda como grupo hermano de Heterobranchia ya se había obtenido previamente en filogenias basadas en datos mitocondriales y combinados (Grande *et al.*, 2008; Arquez *et al.*, 2014). Se ha sugerido que ello es un artefacto debido a un fenómeno de atracción de ramas largas (LBA) (Grande *et al.*, 2008; Stöger y Schrödl, 2013). La resolución de este nodo en particular necesitaría de la secuenciación de genomas mitocondriales de representantes de los diferentes grupos de Patellogastropoda, pues se desconoce si el mitogenoma de *Lottia* es representativo del clado. Esta es una de las grandes cuestiones pendientes de resolver y en la que ya está trabajando el equipo del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid.

La matriz de datos nucleares, en cambio, situó Patellogastropoda como grupo hermano del resto de gasterópodos, y Neritimorpha como grupo hermano de Vetigastropoda, mientras que Caenogastropoda fue agrupado con Heterobranchia (Fig. 4, Capítulo 3.2). Este resultado concuerda con la filogenia clásica de Ponder y Lindberg (1997), que apoya la división de los gasterópodos en dos subclases

(Eogastropoda y Orthogastropoda) y la monofilia de Apogastropoda (Caenogastropoda + Heterobranchia). Sin embargo, los soportes estadísticos de este análisis fueron bajos.

La matriz combinada (mitocondrial + nuclear) mostró unas topologías similares a las de los análisis basados solo en datos mitocondriales. Ambos árboles (ML y BI) recuperaron Patellogastropoda como grupo hermano de Heterobranchia. Además, se recupera (con un soporte muy alto) un clado que incluye Caenogastropoda, Vetigastropoda y Neritimorpha, los cuales, como se ha mencionado anteriormente compartirían la posición relativa del *trnC* en el genoma mitocondrial. La relación entre Neritimorpha y Vetigastropoda se ha resuelto como grupos hermanos en algunos análisis basados en genomas mitocondriales (Arquez *et al.*, 2014, Williams *et al.*, 2014), mientras que no se recupera en otros basados en diversos fragmentos de genes mitocondriales y nucleares (p. ej., Aktipis y Giribet, 2010) o también basados en el mitogenoma (Castro y Colgan, 2010). En el presente estudio, el clado Vetigastropoda + Neritimorpha quedó totalmente apoyado tanto en las matrices mitocondriales como en la matriz combinada, cuando se utilizaron todos los genomas mitocondriales disponibles de Caenogastropoda (Fig. 2 y Fig. 4, Capítulo 3.3).

4.2.3 FILOGENIA DE LOS CAENOCASTROPODA

La filogenia molecular de Caenogastropoda constituye el objetivo principal de esta tesis y ha sido también reconstruida a partir de matrices de datos mitocondriales, nucleares y combinada (mitocondrial + nuclear) usando métodos probabilísticos (capítulo 3.3).

En los análisis referidos a la matriz de datos mitocondriales (Fig. 2, Capítulo 3.3), la posición relativa de los vermetoideos como grupo hermano del resto de Caenogastropoda no concuerda con las evidencias morfológicas, y podría explicarse por un efecto de atracción de ramas largas (LBA). Como se comentó anteriormente,

los genomas mitocondriales de los vermetoideos presentan notables reordenamientos (Rawlings *et al.*, 2010), los cuales van asociados, generalmente, con altas tasas de sustitución. Por tanto, su posición relativa en la filogenia mitocondrial, aunque tenga un soporte muy alto y haya sido recuperada en otros análisis (p. ej., Zou *et al.*, 2011), se considera un artefacto (ver Williams *et al.*, 2014, que obtienen una posición aún más anómala de los vermetoideos fuera de Caenogastropoda, basándose también en genomas mitocondriales completos). Sin embargo, la matriz de datos nucleares recupera a los vermetoideos dentro de Hypsogastropoda (Fig. 3, Capítulo 3.3), lo que indica que las tasas de evolución altas asociadas a este grupo están restringidas exclusivamente al genoma mitocondrial (Rawlings *et al.*, 2010). La morfología altamente modificada de los vermetoideos determina que éstos hayan sido siempre un grupo bastante complicado de emplazar filogenéticamente. Tradicionalmente fueron relacionados con Cerithioidea (p. ej., Houbbrick, 1988), pero estudios posteriores de la ultraestructura de los espermatozoides rechazaron dicha relación (Healy, 1988) y fueron incluidos en una superfamilia propia (Ponder y Warén, 1988). Aunque su afinidad con los ceritioideos todavía es sostenida por algunos paleontólogos (Bandel, 2006; Bandel y Kiel, 2000) y morfólogos (Simone, 2011), actualmente los verméticos se suelen asignar al grupo parafilético de los Littorinimorpha (Bouchet y Rocroi, 2005; Strong, 2003) o Asiphonata (Ponder *et al.*, 2008), siendo su posición concreta todavía una incógnita.

En general, los análisis basados en la matriz de datos combinada reflejan casi las mismas topologías que los de la matriz de datos mitocondriales, y mostraron unos soportes estadísticos similares en sus nodos (Fig. 4, Capítulo 3.3). No se recuperó la monofilia de los Architaenioglossa (Fig. 2, Capítulo 3.3), grupo que ha sido reconocido tradicionalmente como un conjunto de linajes terrestres y de agua dulce que formaban las primeras 2 ó 3 ramas en el árbol de Caenogastropoda (Ponder y Lindberg, 1997). Su posible monofilia ha sido cuestionada debido a la ausencia de sinapomorfías bien

definidas más allá de su hábitat no marino y, de hecho, actualmente el grupo se considera más bien como un grado parafilético (Ponder *et al.*, 2008). Tanto los análisis morfológicos (Simone, 2011) como los moleculares (Colgan *et al.*, 2007; Harasewych *et al.*, 1998; presente tesis) confirman la parafilia de Architaenioglossa, y su relación entre ellos y con Campaniloidea y Cerithioidea todavía es controvertida. En algunos estudios, las superfamilias de Architaenioglossa se han recuperado como grupo hermano de Campaniloidea (Colgan *et al.*, 2007) o de Cerithioidea (presente tesis), rechazando también la monofilia de Sorbeoconcha. Por otro lado, el árbol filogenético obtenido por Ponder *et al.* (2008), basado en una combinación de datos morfológicos y moleculares mediante BI recuperó Sorbeoconcha como grupo monofilético, con Campaniloidea como grupo hermano de Cerithioidea + Hypsogastropoda. Asimismo, en un estudio filogenético reciente, basado en datos transcriptómicos (Zapata *et al.*, 2014), los Ampullarioidea (representados por *Pomacea*) quedaban situados como grupo hermano de los Sorbeoconcha (monofiléticos), incluyendo este último grupo a Cerithioidea como grupo hermano de Hypsogastropoda.

A su vez, Hypsogastropoda fue recuperado en esta tesis como grupo monofilético (sin tener en cuenta a los vermetoideos) y con soportes muy altos en ambos análisis, como ha sido sugerido también por otros análisis filogenéticos moleculares (Colgan *et al.*, 2007; Harasewych *et al.*, 1998; McArthur y Harasewych, 2003; Ponder *et al.*, 2008; Zapata *et al.*, 2014). Las relaciones internas de Hypsogastropoda son difíciles de resolver, seguramente debido a que sufrieron un evento de radiación muy temprana en los inicios de su historia evolutiva (Colgan *et al.*, 2007). Dentro de este grupo, Bouchet y Rocroi (2005) proponen provisionalmente la división en tres grandes subgrupos (Littorinimorpha, Ptenoglossa y Neogastropoda), mientras que Ponder y Lindberg (2008) proponen su división en los clados que denominaron Siphonate y Asiphonate (Sifonados y Asifonados).

Los resultados obtenidos en el capítulo 3.2 situaron a los Abysochrysoidea como grupo hermano del resto de taxones de Hypsogastropoda, con bajo soporte en el análisis mediante ML y máximo con BI (Fig. 2, Capítulo 3.3). Anteriormente, este enigmático grupo había sido incluido de forma provisional dentro de los Littorinimorpha (Bouchet y Rocroi, 2005) y, en particular, como grupo hermano de Littorinidae, aunque con un soporte muy bajo (Ponder *et al.*, 2008). Otra filogenia molecular basada en datos mitocondriales parciales y loci nucleares recuperó los Abysochrysoidea en un clado con Cingulopsoidea y Triphoroidea, también con escaso soporte estadístico (Takano y Kano, 2014).

En el siguiente nodo dentro de Hypsogastropoda (Fig. 2, Capítulo 3.2), el clado Rissooidea + Truncatelloidea (ambos grupos tradicionalmente considerados sinónimos) obtuvo máximo soporte, tanto para el análisis mediante ML como mediante BI, y se recuperó como grupo hermano de Naticoidea + el clado sifonado, aunque solo altamente soportado por BI. Sin embargo, ningún árbol de los obtenidos en el capítulo 3.3 recuperó la monofilia de Littorinimorpha, lo cual ya había ocurrido en estudios moleculares y morfológicos previos (Colgan *et al.*, 2007; Ponder *et al.*, 2008; Simone, 2011), que asimismo rechazan la monofilia de los asifonados. Los Ptenoglossa, grupo tradicionalmente constituido por las superfamilias Eulimoidea, Epitonioidea (= Janthinoidea) y Triphoroidea, se consideran hoy día como un grupo parafilético (Ponder y Lindberg, 1997; Ponder *et al.*, 2008; Takano y Kano, 2014) y son tratados como un “grupo informal” en la clasificación de Bouchet y Rocroi (2005). Sin embargo, no se ha secuenciado ningún genoma mitocondrial de una especie de Ptenoglossa hasta la fecha, por lo que este grupo no se incluyó en los análisis de la presente tesis.

Por su lado, el clado sifonado de Ponder y Lindberg (2008) obtuvo un alto valor de soporte tanto en el análisis mediante ML como mediante BI. Los miembros de este clado se caracterizan por haber desarrollado un sifón anterior, a menudo largo y móvil, paralelamente al aumento de la superficie del osfradio, lo que permite una detección a

mayor distancia de cualquier estímulo (localización de predadores, comida y reproducción) y discernir la dirección desde la que proviene dicho estímulo (Lindberg y Ponder, 2001). El árbol mediante ML relacionó a Stromboidea y Cypraeoidea, con un soporte moderado, y como grupo hermano al resto del clado sifonado. En el árbol mediante BI, Stromboidea aparece como el primer linaje en separarse, mientras que Cypraeoidea se recupera como grupo hermano del resto del clado sifonado con un soporte moderado (Fig. 2, Capítulo 3.3). Calyptraeidea y Xenophoroidea, que han sido asociados con anterioridad al clado sifonado (Colgan *et al.*, 2007; Ponder *et al.*, 2008), a pesar de carecer del sifón anterior, no fueron incluidos en el presente trabajo debido a que no se encuentran disponibles genomas mitocondriales de representantes de estas superfamilias.

Dentro de los sifonados, la superfamilia Cancellarioidea (que siempre ha sido incluida dentro de los Neogastropoda) resulta como grupo hermano de Tonnoidea y del resto de Neogastropoda en el análisis con ML, aunque con un bajo soporte (Fig. 2, Capítulo 3.2). Tonnoidea y Neogastropoda comparten algunos caracteres, como la posesión de una probóscide pleuroembólica y los hábitos depredadores, y han sido colocados por Simone (2011) en un mismo clado, que denominó Peogastropoda. Sin embargo, mientras los análisis morfológicos recuperan Neogastropoda como grupo monofilético (Ponder *et al.*, 2008; Simone, 2011; Strong, 2003), las filogenias moleculares (p. ej. Colgan *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2009; Hayashi, 2005; Williams *et al.*, 2014) normalmente recuperan a los tonnoideos dentro de Neogastropoda (ver Zou *et al.*, 2011, como excepción).

La posición basal de Cancellarioidea dentro de Neogastropoda ha sido sugerida en algunos análisis morfológicos (Kantor, 1996) y moleculares (Oliverio y Modica, 2010), pero su posición basal a los tonnoideos solo fue obtenida en estudios previos basados en genomas mitocondriales completos (Cunha *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2014), así como en nuestros resultados. Por tanto, a la luz de nuestros resultados, la

monofilia de Neogastropoda solo es posible, si los Tonnoidea son considerados como parte del grupo (Fig. 2, Capítulo 3.3) o los Cancellarioidea excluidos de él.

Las clasificaciones de Neogastropoda generalmente reconocen 6 superfamilias: Buccinoidea, Muricoidea, Olivoidea, Pseudolivoidea, Conoidea y Cancellarioidea (ver Bouchet y Rocroi, 2005). Sin embargo, las relaciones filogenéticas entre las distintas familias todavía permanecen algo inestables y la monofilia de algunas de ellas es cuestionable. En este sentido, de nuestros resultados quizá el más revelador sea la posición relativa de las familias Babyloniidae y Volutidae en las filogenias (con un soporte muy alto para ambas en el análisis de BI y solo para Volutidae en el de ML) que rechazan la monofilia de Muricoidea, lo que justificaría elevar al rango de superfamilias a Babylonioidae y Volutoidae. Mientras Babyloniidae es una familia más bien reducida (comprende solo los géneros *Babylonia* y *Zemiropsis*), la familia Volutidae es muy diversa, con alrededor de 40 géneros reconocidos, por lo que serían precisos datos de otros géneros de Volutidae para perfilar mejor esta superfamilia. Una relación filogenética más cercana de Volutidae (*Melo*) con Cancellarioidea y Conoidea, en lugar de con Muricoidea, fue también obtenida por Zou *et al.* (2011) basándose en un análisis con secuencias de los genes nucleares *18S* (completo) y *H3* (parcial), y los mitocondriales *cox1*, *rrnL* y *rrnS*. La posición taxonómica de Babyloniidae ha sido controvertida. Tradicionalmente, se asignaba a la superfamilia Buccinoidea y, más recientemente, a Muricoidea (Bouchet y Rocroi, 2005). Los análisis filogenéticos soportan por un lado afinidades cercanas de *Babylonia* a Volutidae y Olividae (Harasewych y Kantor, 2002), o a Turbinellidae (Zou *et al.*, 2011) basándose en análisis morfológicos y moleculares, respectivamente.

4.3 RELOJ MOLECULAR: TIEMPOS DE DIVERGENCIA

La inclusión en la presente tesis del genoma mitocondrial de *Ifremeria nautiliei*, representante de Abysochrysoidea, una superfamilia endémica de los hábitats quimioautótrofos profundos y cuya ubicación filogenética no era clara, fue aprovechada para datar mediante un reloj molecular la divergencia del grupo (y de Caenogastropoda en general). Se trataba de averiguar si es un grupo antiguo que pudo haber sobrevivido a las sucesivas extinciones masivas en el océano o si su origen es más reciente, a partir de un ancestro de ambientes superficiales fotoautótrofos.

El árbol relajado reconstruido (Fig. 6, Capítulo 3.2) situó el origen de los gasterópodos hace 517 Ma aproximadamente. Teniendo en cuenta que el fósil más antiguo asignado a los moluscos es *Kimberella* (Fendokin y Waggoner, 1997) del Precámbrico Superior (entre los 558-555 Ma), los resultados incluidos en el capítulo 3.2 indican una temprana diversificación de las principales clases de moluscos (incluyendo Gastropoda) poco después del origen del phylum. Sin embargo, la divergencia de los Caenogastropoda se produjo (según los resultados obtenidos) en un periodo muy posterior, en torno a los 238 Ma, y su gran radiación (tasas de diversificación aceleradas) entre los 172-140 Ma, periodo en el que parecen tener su origen las principales superfamilias de cenogasterópodos derivados. Por su lado, la filogenia cronológica obtenida por Zapata *et al.* (2014) sitúa el origen de los Caenogastropoda en la transición Pérmico/Triásico y dichos autores señalan que su diversificación se inició después de la extinción masiva del finales del Pérmico (hace unos 258 Ma), responsable de la extinción de la mayor parte de la biota oceánica y del posterior cambio de los ecosistemas marinos y de su composición faunística. Este periodo coincidió también con el inicio de la gran radiación de los Heterobranchia, de acuerdo los resultados obtenidos en la presente tesis, coincidentes con los de Zapata *et al.* (2014).

La divergencia de Abysochrysoidea del resto de Caenogastropoda, según los resultados obtenidos, ocurrió sobre los 154 (144-168) Ma. Este dato estaría en consonancia con el fósil más antiguo conocido de Abysochrysidae (*Acanthostrophia acanthica*), que data del Jurásico Medio de Italia (Bajociense; 168-170 Ma) (Kaim *et al.*, 2008). Los fósiles más antiguos de las familias Provannidae y Hokkaidoconchidae han sido encontrados en depósitos que datan del Jurásico superior (Kaim *et al.*, 2008; Kiel *et al.*, 2008; Kiel, 2010). En conjunto, la posición de *Ifremeria* en la filogenia reconstruida y el tiempo de divergencia correspondiente al nodo que le corresponde, apoya que el origen de Abysochrysoidea es relativamente moderno (Mesozoico Superior-Cenozoico Inferior), lo que concuerda con el registro fósil (Little y Vrijenhoek, 2003), y dentro del rango 93-228 Ma, inferido anteriormente a partir de fragmentos de genes mitocondriales y nucleares (Johnson *et al.*, 2010). Estos datos contradicen la teoría de un origen muy antiguo de los taxones de las fuentes hidrotermales profundas y su supervivencia a los eventos de extinción masiva en estos refugios (ver, p. ej., McArthur y Tunnicliffe, 1998). En este sentido, se ha propuesto que la mayor parte de la fauna del océano profundo se extinguió durante el evento anóxico del Cenomaniense-Turonense (Cretácico Superior), y la fauna moderna de las fumarolas submarinas y ambientes hidrotermales ocupó estos nichos vacíos a partir de refugios de aguas menos profundas (Jacobs y Lindberg, 1998).



5. Conclusiones

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral pueden destacarse las siguientes conclusiones generales:

1. Utilizando técnicas de secuenciación tradicionales y de nueva generación, se aportan las secuencias completas de los genomas mitocondriales de cinco especies de moluscos, el aplacóforo *Scutopus ventrolineatus* Salvini-Plawen, 1968 (Chaetodermomorpha) y los cenogasterópodos *Cochlostoma hidalgoi* (Crosse, 1864) ("Architaenioglossa", Cyclophoroidea), *Ifremeria nautilei* Bouchet y Warén, 1991 ("Littorinimorpha", Abyssochrysoidea), *Naticarius hebraeus* (Martyn, 1786) ("Littorinimorpha", Naticoidea), *Galeodea echinophora* (Linnaeus, 1758) ("Littorinimorpha", Tonnoidea) y *Columbella adansoni* Menke, 1853 (Neogastropoda, Buccinoidea), así como el genoma casi completo de *Erosaria spurca* (Linnaeus, 1758) ("Littorinimorpha", Cypraeoidea).
2. El ordenamiento de los genes codificantes de proteínas del genoma mitocondrial del caudofoveado *Scutopus ventrolineatus* es muy similar al publicado para los genomas mitocondriales de Polyplacophora, Cephalopoda y para los de los linajes que primero divergieron en Bivalvia y Gastropoda (Vetigastropoda y Neritimorpha, pero no Patellogastropoda). Se ha inferido dicho ordenamiento para un hipotético molusco ancestral, y sería similar al publicado para otros Spiralia, especialmente Phoronida, Brachiopoda, Nemertea y Entoprocta.
3. Los genomas mitocondriales de Caenogastropoda, Vetigastropoda y Neritimorpha presentan un orden génico muy parecido. En particular, la posición relativa del gen *trnC* entre los genes *trnY* y *trnW*, es compartida por estos tres grupos pero no por otros gasterópodos, por lo que se considera una sinapomorfía molecular que indicaría un ancestro común.

4. El orden génico del genoma mitocondrial de *Ifremeria nautili* es muy similar al de otros Caenogastropoda y difiere, tan solo, en la posición relativa del gen *trnW*. La transposición del gen *trnW* en esta especie es compartida con *Alviniconcha*, pero no con otros Abysochrysoidea.
5. El uso de los genomas mitocondriales completos, por sí solos, para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas de los moluscos, no es suficiente debido a la alta heterogeneidad de las tasas evolutivas entre los distintos linajes, lo que provoca fenómenos de atracción de ramas largas. Esta heterogeneidad es menor entre superfamilias dentro de una clase y, a este nivel, la información filogenética de los genomas mitocondriales es muy útil. En cualquier caso, los análisis filogenéticos muestran que los mejores resultados se obtienen combinando genes mitocondriales y nucleares.
6. El árbol filogenético reconstruido a partir de datos mitocondriales y nucleares de representantes de siete de las ocho clases del filo Mollusca recuperó la monofilia de Aplacophora, Aculifera y Conchifera. Dentro de los Conchíferos, los Cefalópodos resultaron como grupo hermano de Gasterópodos y Bivalvos + Escafópodos.
7. Dentro de los Gastropoda, se recuperan por un lado los Patellogastropoda como grupo hermano de Heterobranchia, y por otro, los Vetigastropoda como grupo hermano de Neritimorpha y Caenogastropoda. Esta topología no se considera definitiva debido a un problema de atracción de ramas largas entre Patellogastropoda y Heterobranchia.
8. Los análisis filogenéticos centrados en los Caenogastropoda confirman su monofilia y, dentro de ellos, tanto la de Hypsogastropoda como la de un grupo sifonado que incluye las superfamilias Stromboidea, Cypraeoidea, Tonnoidea y el linaje Neogastropoda. En cambio, “Architaenioglossa” y “Littorinimorpha” son considerados grados evolutivos.

9. No se recupera la monofilia de Neogastropoda debido a la posición relativa de la superfamilia Tonnoidea que separa a la superfamilia Cancellarioidea del resto de Neogastropoda. La superfamilia Muricoidea es polifilética. Para compatibilizar taxonomía y filogenia se propone restringir Muricoidea a la familia Muricidae y crear al menos dos nuevas superfamilias, Volutioidea y Babylonioidea, a la espera del análisis filogenético del resto de murícidos.
10. Se confirma la pertenencia de los Abysochrysoidea a los Caenogastropoda y su relación cercana a las superfamilias de Hypsogastropoda. El origen de los Abysochrysoidea se sitúa en el Jurásico Superior - Cretácico Inferior, lo que indica una colonización relativamente moderna de los ambientes quimioautótrofos del océano profundo por parte de estos gasterópodos.

5. CONCLUSIONS

From the results obtained in this thesis the following general conclusions can be highlighted:

1. Six new complete mitochondrial genomes of molluscs have been sequenced with traditional and next generation sequencing, the Aplacophora *Scutopus ventrolineatus* Salvini-Plawen, 1968 (Chaetodermomorpha) and the Caenogastropoda: *Cochlostoma hidalgoi* Crosse, 1864 ("Architaenioglossa", Cyclophoroidea), *Ifremeria nautilei* Bouchet y Warén, 1991 ("Littorinimorpha", Abysochrysoidea), *Naticarius hebraeus* Martyn, 1786 ("Littorinimorpha", Naticoidea), *Galeodea echinophora* Linnaeus, 1758 ("Littorinimorpha", Tonnoidea), and *Columbella adansoni* Menke, 1853 (Neogastropoda, Buccinoidea), as well as the almost complete mitochondrial genome of *Erosaria spurca* Linnaeus, 1758 ("Littorinimorpha", Cypraeoidea).
2. The relative position of the protein coding genes in the mitochondrial genome of the caudofoveate *Scutopus ventrolineatus* is quite similar to those already reported for Polyplacophora, Cephalopoda and early diverging lineages of Bivalvia and Gastropoda (Vetigastropoda and Neritimorpha, but not Patellogastropoda). The aforementioned gene order arrangement has been inferred for a hypothetical ancestral mollusc and it would be very similar to those published for other Spiralia, specially Phoronida, Brachiopoda, Nemertea and Entoprocta.
3. The complete mitochondrial genomes of Caenogastropoda, Vertigastropoda and Neritimorpha show a very similar gene arrangement. Particularly, the relative position of *trnC* gene between *trnY* and *trnW* genes is shared between these three groups but not by other gastropods, thus it is considered as a molecular synapomorphy, which would indicate a common ancestor.

4. The gene order of the complete mitochondrial genome of *Ifremeria nautiliei* is very similar to that of other Caenogastropoda and differs only in the relative position of the *trnW* gene. The translocation of the *trnW* gene in this species is shared with *Alviniconcha*, but not with other Abysochrysoidea.
5. The use of complete mitochondrial genomes alone for reconstructing the phylogenetic relationships of molluscs is flawed by the existence of high heterogeneity of evolutionary rates among lineages that produce long branch attraction phenomena. This heterogeneity is lower between superfamilies within the same class, and at this level the phylogenetic information derived from complete mitochondrial genomes is very useful. Nonetheless, phylogenetic analyses show that best results are achieved combining mitochondrial and nuclear genes.
6. The reconstructed phylogenetic tree based on mitochondrial and nuclear data from seven out of the eight classes within the phylum Mollusca, recovered the monophyly of Aplacophora, Aculifera and Conchifera. Within Conchifera, Cephalopoda was the sister group of Gastropoda and Bivalvia+ Scaphopoda.
7. Within Gastropoda, Patellogastropoda was recovered as sister group of Heterobranchia, whereas Vetigastropoda was recovered as sister group of Neritimorpha and Caenogastropoda. This topology could not be considered as final due to long-branch attraction biases between Patellogastropoda and Heterobranchia.
8. The phylogenetic analyses focus on Caenogastropoda confirmed its monophyly, and within the group, both that of Hypsogastropoda as well as of a siphonate group that includes the superfamilies Stromboidea, Cypraeoidea, Tonnoidea and the Neogastropoda lineage. In contrast, "Architaenioglossa" and "Littorinimorpha" are considered as an evolutionary grade.

9. The monophyly of Neogastropoda is not recovered due to the relative position of the superfamily Tonnoidea that splits the superfamily Cancellarioidea from the rest of Neogastropoda. The superfamily Muricoidea is polyphyletic. In order to make taxonomy and phylogeny compatible, we propose to restrict Muricoidea to the family Muricidae and at least erect two new superfamilies, Volutioidea and Babylonioidea, awaiting for a phylogenetic analysis of the rest of the muricids.
10. Abysochrysoidea is confirmed to belong to Caenogastropoda and is closely related to the superfamilies of Hypsogastropoda. The origin of Abysochrysoidea is dated in the Late Jurassic-Early Cretaceous indicating a relatively modern colonization of deep-sea chemoautotrophy environments by these gastropods.



6. Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aktipis S.W., Giribet G. 2012. Testing relationships among the vetigastropod taxa: a molecular approach. *Journal of Molluscan Studies*, 78: 12-27.
- Aktipis S.W., Giribet G., Lindberg D.R., Ponder W.F. 2008. Gastropoda: An overview and analysis. En: Ponder W.F., Lindberg D.R. (eds) *Phylogeny and evolution of the Mollusca* (pp. 201-237). University of California Press, Berkeley, CA.
- Arbogast B.S., Edwards SV, Wakeley J, Beerli P, Slowinski JB. 2002. Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. *Annu Rev Ecol Syst*, 33: 707-740.
- Arquez M., Colgan D., Castro L.R., 2014. Sequence and comparison of mitochondrial genomes in the genus *Nerita* (Gastropoda: Neritimorpha: Neritidae) and phylogenetic considerations among gastropods. *Marine Genomics* 15, 45-54.
- Bandel K. 1982. Morphologie und Bildung der frühontogenetischen Gehäuse bei conchiferen Mollusken. *Facies*, 7: 1-198.
- Bandel K. 1993. Caenogastropoda during Mesozoic times. *Scripta Geol.* 2, 7-56 (Special issue).
- Bandel K. 1997. Higher classification and pattern of evolution of the Gastropoda. A synthesis of biological and paleontological data. *Courier. Forschungs Institut. Senckenberg*, 201: 57-81.
- Bandel K., Kiel, S. 2000. Earliest known (Campanian) members of the Vermetidae, Provannidae and Litiopidae (Cerithioidea, Gastropoda), and a discussion of their possible relationships. *Mitteilungen aus dem Geologisch-Paläontologischen Institut der Universität Hamburg*, 84, 209-218.
- Bandel K. 2002. Reevaluation and classification of Carboniferous and Permian Gastropoda belonging to the Caenogastropoda and their relation. *Mitteilungen aus dem Geologisch-Paläontologischen Institut der Universität Hamburg* 86: 81-188.
- Bandel K, Heidelberger D. 2002. A Devonian member of the subclass Heterostropha (Gastropoda) with valvatoïd shell shape. *Neues Jahrb Geol Palaontol-Monatsh* 2002: 533-550.
- Bandel K. 2006. Families of the Cerithioidea and related superfamilies (Palaeo-Caenogastropoda; Mollusca) from the Triassic to the Recent characterized by protoconch morphology-including the description of new taxa. *Freiberger Forschungshefte C*, 511(14), 59-138.
- Bandyopadhyay P.K., Stevenson B.J., Cady M.T., Olivera B.M., Wolstenholme DR. 2006. Complete mitochondrial DNA sequence of a Conoidean gastropod, *Lophiotoma (Xenuroturrus) cerithiformis*: gene order and gastropod phylogeny. *Toxicon* 48: 29-43.
- Beesley P.L., Ross G.J.B., Wells A. (eds). 1998. *Fauna of Australia*, Vol. 5 Part B, *Mollusca: The Southern Synthesis*. Melbourne: CSIRO Publishing.
- Bernt M., Braband A., Schierwater B., Stadler P.F. 2013. Genetic aspects of mitochondrial genome evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 328-338.

- Bieler R. 1990. Haszprunar's 'clado-evolutionary' classification of the Gastropoda - a critique. *Malacologia* 31: 371-380.
- Bieler R. 1992. Gastropod phylogeny and systematics. *Annual Review of Ecology Systematics*, 23: 311-338.
- Boore J.L., Macey J.R., Medina M. 2005. Sequencing and comparing whole mitochondrial genomes of animals. *Methods Enzymol* 395: 311-348.
- Boss K. 1982. Mollusca. Pp. 945-1161 in Synopsis and Classification of Living Organisms (S. P. Parker, ed). McGraw Hill, New York.
- Bouchet P., Rocroi J.P. (Eds.). 2005. Working classification of the Gastropoda. *Malacologia* 47: 240-283.
- Bouvier E.L. 1887. Système nerveux, morphologie générale et classification des Gastéropodes Prosobranches. *Annales des Sciences Naturelles. Zoologie* 7: 1-510.
- Breton S., Beaupre H.D., Stewart D.T., Hoeh W.R., Blier P.U. 2007. The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough?. *Trends in Genetics*, 23(9), 465-474.
- Brezinger B., Haszprunar G., Schröl M. 2014a. At the limits of a successful body plan - 3D microanatomy, histology and evolution of Helminthope (Mollusca: Heterobranchia: Rhodopemorpha), the most worm-like gastropod. *Frontiers in Zoology* 10:37, 26 pp.
- Brezinger B., Wilson N.G., Schröl M. 2014b. Microanatomy of shelled *Koloonella cf. minutissima* (Laseron, 1951) (Gastropoda: 'lower' Heterobranchia: Murchisonellidae) does not contradict a sister-group relationship with enigmatic Rhodopemorpha slugs. *Journal of Molluscan Studies* 80: 518-540.
- Castro L.R., Colgan D.J. 2010. The phylogenetic position of Neritimorpha based on the mitochondrial genome of *Nerita melanotragus* (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 918-923.
- Colgan D.J., Ponder W.F., Eggler P.E. 2000. Gastropod evolutionary rates and phylogenetic relationships assessed using partial 28S rDNA and histone H3 sequences. *Zoologica Scripta* 29: 29-63.
- Colgan D.J., Ponder W.F., Beacham E., Macaranas J.M., 2003. Molecular phylogenetic studies of Gastropoda based on six gene segments representing coding or non-coding and mitochondrial or nuclear DNA. *Molluscan Research*, 23, 123-148.
- Colgan D.J., Ponder W.F., Beacham E., Macaranas J. 2007. Molecular phylogenetics of Caenogastropoda (Gastropoda: Mollusca). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 717-737.
- Cox L.R. 1960. Thoughts on the classification of the Gastropoda. *Proceedings of the Malacological Society of London* 33: 239-261.
- Criscione F., Ponder W.F. 2013. A phylogenetic analysis of rissooidean and cingulopsoidean families (Gastropoda: Caenogastropoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 1075-1082.
- Cunha R.L., Grande C., Zardoya R. 2009. Neogastropod phylogenetic relationships based on entire mitochondrial genomes. *BMC Evolutionary Biology* 9: 210.
- Cuvier G. 1798. Tableau élémentaire de l'histoire naturelle des animaux. Bodouin, Paris, 774 pp.

- Desbruyères D., Segonzac M., Bright M. (eds) 2006. Handbook of deep-sea hydrothermal vent fauna. *Denisia* 18: 1-544.
- Dinapoli A., Klussmann-Kolb A. 2010. The long way to diversity - phylogeny and evolution of the Heterobranchia (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 60-76.
- Drummond A.J., Ho S.Y.W., Phillips M.J., Rambaut A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4: 699-710.
- Dzik J., Mazurek, D. 2013. Affinities of the alleged earliest Cambrian gastropod *Aldanella*. *Canadian Journal of Zoology*, 91: 914–923
- Emberton K.C., Kuncio G.S., Davis G.M., Phillips S.M., Monderewicz K.M., Guo Y.H. 1990. Comparison of recent classifications of stylommatophoran land-snail families, and evaluation of large ribosomal-RNA sequencing for their phylogenetics. *Malacologia* 31: 327-352.
- Freeman G., Lundelius J.W. 1992. Evolutionary implications of the mode of D quadrant specification in coelomates with spiral cleavage. *Journal of Evolutionary Biology* 5: 205-248.
- Fretter V, Graham A. 1962. *British Prosobranch Molluscs*, Ray Society, London.
- Fryda J. 1999. Higher classification of Paleozoic gastropods inferred from their early shell ontogeny. *Journal of the Czech Geological Society* 44: 137-154.
- Fryda, J., Nützel A., Wagner, P.J. 2008. Paleozoic Gastropoda. En: Ponder W.F., Lindberg D.R. (eds) *Phylogeny and evolution of the Mollusca* (pp. 239-270). University of California Press, Berkeley, CA.
- Fryda, J. 2012 Phylogeny of Palaeozoic Gastropods Inferred from Their Ontogeny. In: *Earth and Life: International Year of Planet Earth* (Talent, J., ed), pp. 395-435. Springer Netherlands.
- Geiger D.L., Nützel A., Sasaki T. 2008. Vetigastropoda. En: Ponder W.F., Lindberg D.R. (eds) *Phylogeny and evolution of the Mollusca* (pp. 297-330). University of California Press, Berkeley, CA.
- Giribet, G., Akiko O., Lindgreen, A. R., Huff, S. W., Schrödl, M., Nishiguchi, M.K. 2006 Evidence for a clade composed of molluscs with serially repeated structures: Monoplacophorans are related to chitons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Golikov A., Starobogatov Y.I. 1975. Systematics of prosobranch gastropods. *Malacologia*, 11: 185-232.
- Graham A. 1985. Evolution within the Gastropoda: Prosobranchia. In *The Mollusca*, Vol. 10, *Evolution*. Edited by E. R. Trueman and M. R. Clark. New York: Academic Press, 151–186.
- Grande C., Templado J., Cervera J.L., Zardoya R. 2004a. Molecular Phylogeny of Euthyneura (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Biology and Evolution*, 21(2): 303-313.
- Grande C., Templado J., Cervera J.L., Zardoya R. 2004b. Phylogenetic relationships among Opisthobranchia (Mollusca: Gastropoda) based on mitochondrial cox 1 and rrnL genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 378-388.
- Grande C., Templado J., Zardoya R. 2008. Evolution of gastropod mitochondrial genome arrangements. *BMC Evolutionary Biology*, 8:61, 15 pp.
- Harasewych M.G., Adamkewicz S.L., Blake J.A., Saudek S., Spriggs T., Bult C.J. 1997a. Phylogeny and relationships of pleurotomariid gastropods (Mollusca:

- Gastropoda): an assessment based on partial 18S rDNA and cytochrome c oxidase I sequences. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6: 1-20.
- Harasewych M.G., Adamkewicz S.L., Blake J.A., Saudek D., Spriggs T., Bult C.J. 1997b. Neogastropod phylogeny: a molecular perspective. *Journal of Molluscan Studies*, 63: 327-351.
- Harasewych M.G., Adamkewicz S.L., Plassmeyer M., Gillevet P.M. 1998. Phylogenetic relationships of the lower Caenogastropoda (Mollusca, Gastropoda, Architaenioglossa, Campaniloidea, Cerithioidea) as determined by partial 18S rDNA sequences. *Zoologica Scripta*, 27, 361-372.
- Harasewych, M.G., Kantor, Y.I. 2002. *Buccinum thermophilum* (Gastropoda: Neogastropoda: Buccinidae), a new species from the Endeavour vent field of the Juan de Fuca Ridge. *Journal of Molluscan Studies*, 68(1), 39-44.
- Haszprunar G. 1985a. The fine morphology of the osphradial sense organs of the Mollusca. Part 1: Gastropoda-Prosobranchia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, 307: 457-496.
- Haszprunar G. 1985b. The Heterobranchia- a new concept of the phylogeny and evolution of the higher Gastropoda. *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforsch*, 23: 15-37.
- Haszprunar G. 1988. On the origin and evolution of major gastropod groups, with special reference to the Streptoneura (Mollusca). *Journal of Molluscan Studies*, 54, 367-441.
- Haszprunar, G. 2000 Is the Aplacophora monophyletic? A cladistic point of view. *American Malacological Bulletin*, 15: 115-130.
- Haszprunar, G., Schander, C., Halanych, K.M. 2008 Relationships of the higher molluscan taxa. En: Ponder W.F., Lindberg D.R. (eds) *Phylogeny and evolution of the Mollusca* (pp. 19-32). University of California Press, Berkeley, CA.
- Haszprunar G., Speimann E., Hawe, A., Heß M. 2011. Interactive 3D anatomy and affinities of the Hyalogyrinidae, basal Heterobranchia (Gastropoda) with a rhipidoglossate radula. *Organisms, Diversity and Evolution*, 11: 201-236.
- Haszprunar, G., Wanninger, A. 2012 Molluscs. *Current Biology*, 22: R510-R514.
- Haszprunar, G., Ruthensteiner, B. 2013. Monoplacophora (Tryblidia)-Some Unanswered Questions*. *American Malacological Bulletin*, 31(1), 189-194.
- Hatzoglou H.C., Rodakis G., Lecanidou R. 1995. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinaria coerulea*. *Genetics*, 140: 1353-1366.
- Havird J.C, Santos S.R. 2014. Performance of single and concatenated sets of mitochondrial genes at Inferring metazoan relationships relative to full mitogenome data. *PLoS ONE*, 9(1): e84080.
- Hayashi, S. 2005. The molecular phylogeny of the Buccinidae (Caenogastropoda: Neogastropoda) as inferred from the complete mitochondrial 16S rRNA gene sequences of selected representatives. *Molluscan Research*, 25(2), 85-98.
- Heß, M., Beck, F., Gensler, H., Kano, Y., Kiel, S., Haszprunar G. 2008. Microanatomy, shell structure and molecular phylogeny of *Leptogyra*, *Xyleptogyra* and *Leptogyropsis* (Gastropoda, Neomphalida, Melanodrymiidae) from sunken wood. *Journal of Molluscan Studies*, 78: 383-401.

- Healy J.M. 1988. Sperm morphology and its systematic importance in the Gastropoda. In: Ponder, W.F. (Ed.), *Prosobranch Phylogeny. Malacological Review Supp.* 4, pp. 251-266.
- Healy J.M. 1990. Taxonomic affinities of the deep-sea genus *Provanna* (Caenogastropoda): new evidence from sperm ultrastructure. *Journal of Molluscan Studies* 56: 119-122.
- Healy J.M., 1996. Molluscan sperm ultrastructure: correlation with taxonomic units within the Gastropoda, Cephalopoda and Bivalvia. En: Taylor, J.D. (Ed.), *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca* (pp. 99-113). Oxford University Press, Oxford.
- Hennig, W. 1950 *Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik*. Deutscher Zentralverlag, Berlin.
- Hidaka, H., Watanabe, H., Kano, Y., Kojima, S. 2012 Mitochondrial genome rearrangement in a hydrothermal vent-endemic lineage of provannid gastropods provides a new DNA marker for phylogeographical studies. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, FirstView: 1-6
- Houbrick, R.S. 1988. Cerithioidean phylogeny. *Malacological Review, Supplement*, 4, 88-128.
- Hyman L.H. 1967. *The Invertebrates*, Vol. VI. *Mollusca I*. New York: McGraw-Hill.
- Jacobs, D.K., Lindberg, D.R. 1998. Oxygen and evolutionary patterns in the sea: onshore/offshore trends and recent recruitment of deep-sea faunas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9396-9401.
- Johnson S.B., Warén, A., Lee R.W., Kano Y., Kaim A., Davis A., Strong E.E., Vrijenhoek R.C. 2010. *Rubyspira*, new genus and two new species of bone-eating deep-sea snails with ancient habits. *The Biological Bulletin* 219, 166-177.
- Jörger K., Stöger I., Kano Y., Fukuda H., Knebelberger T., Schrödl M. 2010. On the origin of Acochlidia and other enigmatic euthyneuran gastropods, with implications for the systematics of Heterobranchia. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 1-20.
- Kaim A. 2004. The Evolution of Conch Ontogeny in Mesozoic Open Sea Gastropods. *Paleontologia Polonica*, 62: 3-183.
- Kaim A., Jenkins R.G., Warén A. 2008. Provannid and provannid-like gastropods from the Late Cretaceous cold seeps of Hokkaido (Japan) and the fossil record of the Provannidae (Gastropoda: Abysochrysoidea). *Zoological Journal of the Linnean Society* 154: 421-436.
- Kano, Y., Kimura, S., Kimura, T., Warén, A. 2012 Living Monoplacophora: morphological conservatism or recent diversification? *Zoologica Scripta*, 41: 471-488.
- Kantor Y. 1996. Phylogeny and relationships of Neogastropoda. In: Taylor, J. (Ed.), *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca* (pp. 221-230). Oxford University Press.
- Kiel S., Little C.T.S. 2006. Cold-Seep Mollusks Are Older Than the General Marine Mollusk Fauna. *Science* 313, 1429-1431.
- Kiel, S. 2008. An unusual new gastropod from an Eocene hydrocarbon seep in Washington State. *Journal Information*, 82(1).

- Kiel, S. 2010. The fossil record of vent and seep mollusks. In *The vent and seep biota* (pp. 255-277). Springer Netherlands.
- Knight, J.B., Cox, L.R., Batten, R.L., Yochelson, E.L. 1960. Systematic descriptions. In *Treatise on Invertebrate Paleontology*. Part I, *Mollusca 1*. Edited by R. C. Moore. Lawrence, KS: University of Kansas Press, pp. I169-I324.
- Kojima S., Segawa R., Fujiwara Y., Hashimoto, J., Ohta S. 2000. Genetic Differentiation of Populations of a Hydrothermal Vent-Endemic Gastropod, *Ifremeria nautilei*, between the North Fiji Basin and the Manus Basin revealed by Nucleotide Sequences of Mitochondrial DNA. *Zoological Science*, 17: 1167-74.
- Kocot, K.M., Cannon, J.T., Todt, C., Citarella, M.R., Kohn, A.B., Meyer, A., Santos, S.R., Schander, C., Moroz, L.L., Lieb, B., Halanych, K.M. 2011 Phylogenomics reveals deep molluscan relationships. *Nature*, 477(7365), : 452-456.
- Kocot K.M., Halanych K.M., Krug P.J. 2013. Phylogenomics supports Panpulmonata: opisthobranch paraphyly and key evolutionary steps in a major radiation of gastropod molluscs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69(3): 764-71.
- Kohn A.J. 1990. Tempo and mode of evolution in Conidae. *Malacologia* 32: 55-67.
- Lavrov D. 2007. Key transitions in animal evolution: a mitochondrial DNA perspective. *Integrative and Comparative Biology* 47(5): 734-743.
- Lindberg D.R. 1988. The Patellogastropoda. In: Ponder WF, ed. *Prosobranch Phylogeny*. *Malacological Review*, Supplement 4: 35-63.
- Lindberg, D.R., Ponder, W.F. 2001. The influence of classification on the evolutionary interpretation of structure a re-evaluation of the evolution of the pallial cavity of gastropod molluscs. *Organisms Diversity Evolution*, 1(4), 273-299.
- Lindberg D.R., Guralnick R.P. 2003. Phyletic patterns of early development in gastropod mollusks. *Evolution and Development* 5: 494-507.
- Lindberg D.R. 2008. Patellogastropoda, Neritimorpha, and Cocculinoidea. En: Ponder W.F., Lindberg D.R. (eds) *Phylogeny and Evolution of the Mollusca* (pp. 271-296). University of California Press, Berkeley, CA.
- Little C.T.S., Vrijenhoek, R.C. 2003. Are hydrothermal vent animals living fossils? *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 582-588.
- Lydeard C., Holznagel W.E., Glaubrecht M, Ponder W.F. 2002. Molecular phylogeny of a circum-global, diverse gastropod superfamily Cerithioidea (Mollusca: Caenogastropoda): pushing the deepest phylogenetic limits of mitochondrial LSU rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22: 399-406.
- Maynard B.T., Kerr L.J., McKiernan J.M., Jansen E.S., Hanna P.J. 2005. Mitochondrial DNA sequence and gene organization in the Australian blacklip abalone *Haliotis rubra* (Leach). *Marine Biotechnology*, 7(6): 645-658.
- McArthur A.G., Tunnicliffe V. 1998. Relics and antiquity revisited in the modern vent fauna. In "Modern Ocean Floor Processes and the Geological Record" (K. Harrison and R. Mills, Eds.), pp. 271-291. *Geological Society London Special Publications*, 148.
- McArthur A.G., Koop B.F. 1999. Partial 28S rDNA sequences and the antiquity of the hidrothermal vent endemic gastropods. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13: 255-274.
- McArthur A.G., Harasewych M.G., 2003. Molecular systematics of the major lineages of the Gastropoda. En: Lydeard, C., Lindberg, D.R. (Eds.). *Molecular*

- Systematics and Phylogeography of Mollusks* (pp. 140-160). Smithsonian Books, Washington.
- Medina M., Lal S., Valles T., Takaoka Y., Dayrat B., Boore J.L., Goslinger T.M. 2011. Crawling through time: Transition of snails to slugs dating back to the Paleozoic based on mitochondrial phylogenomics. *Marine Genomics*, 4: 51-59.
- Meyer C.P. 2003. Molecular systematics of cowries (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 401-459.
- Meyer C.P. 2004. Toward comprehensiveness: Increased molecular sampling within Cypraeidae and its phylogenetic implications. *Malacologia* 46: 127-156.
- Meyer, A., Todt, C., Mikkelsen, N., Lieb, B. 2010 Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 70.
- Milne-Edwards, H. 1848. Note sur la classification naturelle chez Mollusques Gasteropodes. *Annales des Sciences Naturelles* 9: 102-112.
- Morton J.E., Yonge C.M. 1964. Classification and structure of the Mollusca. In: Wilbur K.M, Yonge C.M, eds. *Physiology of the Mollusca*, vol. 1. New York: Academic Press, 1-58.
- Nakagawa S., Shimamura S., Takaki Y., Suzuki Y., Murakami S., Watanabe T., Fujiyoshi S., Mino S., Sawabe T., Maeda T., Makita H., Nemoto S., Nishimura S.I., Watanabe H., Watsuji T., Takai K. 2014. Allying with armored snails: the complete genome of gammaproteobacterial endosymbiont. *ISME J.* 8: 40-51.
- Newman W.A. 1985. The abyssal hydrothermal vent invertebrate fauna: A glimpse of antiquity? *Bulletin of the Biological Society of Washington*, 6: 231-242.
- Nielsen, C. 2012 How to make a protostome. *Invertebrate Systematics*, 26: 25-40.
- Nützel A. 2005. Recovery of gastropods in the Early Triassic. *Comptes Rendus Palevol* 4: 1-17.
- Nützel A., Erwin D.H. 2002. *Battenizyga*, a new early Triassic gastropod genus with a discussion on the gastropod evolution at the Permian/Triassic boundary. *Paläontologische Zeitschrift* 76: 21-26.
- Nützel A., Fryda, J. 2003. Paleozoic plankton revolution: evidence from early gastropod ontogeny. *Geology*, 31(9): 829-831.
- Nützel A., Pan H.Z. 2005. Late Paleozoic evolution of the Caenogastropoda: larval shell morphology and implications for the Permian/Triassic mass extinction event. *Journal of Paleontology* 79: 1175-1188.
- Nützel A., Lehnert O., Fryda J. 2006: Origin of planktotrophy - evidence from early molluscs. *Evolution and Development*, 8: 325-330.
- Oliverio M., Cervelli M., Mariottini P. 2002. ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (Caenogastropoda, Muricoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 63-69.
- Oliverio, M., Modica, M.V. 2010. Relationships of the haematophagous marine snail *Colubraria* (Rachiglossa: Colubrariidae), within the neogastropod phylogenetic framework. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 158(4), 779-800.
- Passamaneck, Y.J., Schander, C., Halanych, K.M. 2004 Investigation of molluscan phylogeny using large-subunit and small-subunit nuclear rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 25-38.

- Perkhaev, P.Y. 2008. The Early Cambrian radiation of Mollusca. En: Ponder W.F., Lindberg D.R. (eds) *Phylogeny and evolution of the Mollusca* (pp. 33-69). University of California Press, Berkeley, CA.
- Ponder W.F. (ed.) 1988. Prosobranch phylogeny. *Malacological Review*, suplement 4, 346 pp.
- Ponder W.F. 1991a. Marine valvatoideans - implications for early heterobranch phylogeny. *Journal of Molluscan Studies* 57: 21-32.
- Ponder W.F., Lindberg D.R. 1996. Gastropod phylogeny- challenges for the '90s. In J. D. Taylor (Ed.) *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca*. Oxford University Press, pp. 135-154.
- Ponder W.F., Lindberg D.R. 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs - a preliminary analysis using morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 119: 83-265.
- Ponder W.F., Lindberg D.R. (Eds.) 2008. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. University of California Press, Berkeley. xi, 469 p.
- Ponder W.F., Warén A. 1988. Classification of the Caenogastropoda and Heterostropha - a list of the family Group and higher category names. *Malacological Review* (Suppl. 4): 288-326.
- Puillandre N., Kantor Y.I., Sysoev A.V., Couloux A, Meyer C., Rawlings T., Todd J.A., Bouchet P. 2008. The dragon tamed? A molecular phylogeny of the Conoidea (Gastropoda). *Journal of Molluscan Studies* 77: 259-272.
- Puillandre N., Samadi S, Boisselier M.C., Sysoev A.V., Kantor Y.I., Cruaud C., Couloux A., Bouchet P. 2008. Starting to unravel the toxoglossan knot: Molecular phylogeny of the "turrids" (Neogastropoda: Conoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 1122-1134.
- Rawlings, T., Macinnis, M., Bieler, R., Boore, J., Collins, T. 2010. Sessile snails, dynamic genomes: gene rearrangements within the mitochondrial genome of a family of caenogastropod molluscs. *BMC Genomics*, 11: 440
- Riedel F. 1995. An outline of cassioidean phylogeny (Mollusca, Gastropoda). *Contributions to Tertiary and Quaternary Geology* 32: 97-132.
- Rosenberg G. 2014. A new critical estimate of named species-level diversity of the recent Mollusca. *American Malacological Bulletin*, 32(1): 308-322.
- Rosenberg G., Davis G.M., Kuncio, G.S. 1992. Extraordinary variation in conservation of D6 28S ribosomal RNA sequences in mollusks: implications for phylogenetic analysis. In F. Giusti, G. Manganelli (Eds) *Abstracts of the 11th International Malacological Congress* (pp. 221-222). Siena, Unitas Malacologica.
- Rosenberg G., Kuncio G.S., Davis G.M., Harasewych, M.G. 1994. Preliminary ribosomal RNA phylogeny of gastropod and unionoid bivalve mollusks. *Nautilus* 108 (Suppl. 2), 111-121.
- Rosenberg G., Tillier S., Tillier A., Kuncio G.S., Hanlon R.T., Masselot M., Williams C.J. 1997. Ribosomal RNA phylogeny of selected major clades in the Mollusca. *Journal of Molluscan Studies* 63: 301-309.
- Runnegar B., Pojeta J. 1974. Molluscan phylogeny: the paleontological viewpoint. *Science*, 186(4161), 311-317.
- Ruthensteiner B., Heß M. 2008. Embedding 3D models of biological specimens in PDF publications. *Microscopy Research and Technique*, 71: 778-786.

- Salvini-Plawen Lv. 1980. A reconsideration of systematics in the Mollusca (Phylogeny and higher classification). *Malacologia* 19: 249-278.
- Salvini-Plawen Lv. Haszprunar G. 1987. The Vetigastropoda and the systematics of streptoneurous Gastropoda (Mollusca). *Journal of Zoology, London* 211: 747-770.
- Salvini-Plawen Lv., Steiner G. 1996. Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca. In Origin and evolutionary radiation of the Mollusca. In: Taylor, J. (Ed.), Origin and evolutionary radiation of the Mollusca. Oxford University Press, pp. 29-51.
- Salvini-Plawen Lv. 2006 The significance of the placophora for molluscan phylogeny. *Venus*, 65: 17.
- Scheltema, A. 1993 Aplacophora as progenetic aculiferans and the coelomate origin of mollusks as the sister taxon of Sipuncula. *Biological Bulletin*, 184: 57-78.
- Scheltema, A.H., Ivanov, D.L. 2002. An aplacophoran postlarva with iterated dorsal groups of spicules and skeletal similarities to Paleozoic fossils. *Invertebrate Biology*, 1-10.
- Schrödl, M., Stöger, I. 2014 A review on deep molluscan phylogeny: old markers, integrative approaches, persistent problems. *Journal of Natural History*, 48: 2773-2804.
- Simison W.B., Lindberg D.R., Boore J.L. 2006. Rolling circle amplification of metazoan mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006: 39: 562-567.
- Simone L.R.L. 2001. Phylogenetic analyses of Cerithioidea (Mollusca, Caenogastropoda) based on comparative morphology. *Arquivos de Zoologia, São Paulo* 36: 147-263.
- Simone L.R.L. 2002. Comparative morphological study and phylogeny of representatives of the Superfamily Calyptraeoidea (including Hipponicoidea) (Mollusca, Caenogastropoda). *Biota Neotropica* 2(2): 1-137.
- Simone L.R.L. 2004. Comparative morphology and phylogeny of representatives of the superfamilies of architaenioglossans and the Annulariidae (Mollusca, Caenogastropoda). *Arquivos do Museu Nacional (Rio de Janeiro)* 64: 387-504.
- Simone L.R.L. 2005. Comparative morphological study of representatives of the three families of Stromboidea and the Xenophoroidea (Mollusca, Caenogastropoda), with an assessment of their phylogeny. *Arquivos de Zoologia, São Paulo* 37:141-267.
- Simone L.R.L. 2011. Phylogeny of the Caenogastropoda (Mollusca), based on comparative morphology. *Arquivos de Zoologia* 42, 161-323.
- Smith S., Wilson N.G., Goetz F., Feehery C., Andrade S.C.S., Rouse G.W., Giribet G., Dunn C.W. 2011. Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. *Nature* 480: 364-367.
- Smith, S.A., Wilson, N.G., Goetz, F.E., Feehery, C., Andrade, S.C., Rouse, G.W., Giribet, G., Dunn, C.W. 2012 Corrigendum: resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. *Nature*.
- Spengel J.W. 1881. Die Geruchsorgane und des Nervensystem der Mollusken. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 35(3): 333-383.
- Stöger, I., Schrödl, M., 2013. Mitogenomics does not resolve deep molluscan relationships (yet?). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69: 376-392.

- Strong E.E., 2003. ReWning molluscan characters: morphology, carácter coding and a phylogeny of the Caenogastropoda. *Zool. J. Linn. Soc.* 137: 447-554.
- Takano T., Kano, Y. 2014. Molecular phylogenetic investigations of the relationships of the echinoderm-parasite family Eulimidae within Hypsogastropoda (Mollusca). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79: 258-269.
- Taylor J.D. (Ed.) Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca. Oxford University Press, 392 pp.
- Taylor J.D., Morris N.J., Taylor C.N. 1980. Food specialization and the evolution of predatory prosobranch gastropods. *Palaeontology* 23: 375-409.
- Taylor D.W., Sohl N.F. 1962. An outline of gastropod classification. *Malacologia* 1: 7-32.
- Telford, M.J., Budd, G.E. 2011 Invertebrate evolution: bringing order to the molluscan chaos. *Current Biology*, 21: R964-966.
- Thaler A.D., Zelnio K., Saleu W., Schultz T.F., Carlsson J., Cunningham C., Vrijenhoek R.C., Van Dover C.L. 2011. The spatial scale of genetic subdivision in populations of *Ifremeria nautilei*, a hydrothermal-vent gastropod from the southwest Pacific. *BMC Evolutionary Biology* 11, 372.
- Thiele J. 1929-31. Handbuch de systematischen weichtierkunde, Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Tillier S., Masselot M., Guerdoux J., Tillier A. 1994. Monophyly of major gastropod taxa tested from partial 28S rRNA sequences, with emphasis on Euthyneura and hot-vent limpets Peltospiroidea. *Nautilus*, 108 (Suppl. 2): 122-140.
- Tillier S., Masselot M., Hervé P., Tillier A. 1992. Phylogénie moléculaire des Gastropoda (Mollusca) fondée sur le séquençage partiel de l'ARN ribosomique 28S. *Comptes Rendus Academie de Sciences (Paris)*, 134 (Ser., 3): 79-85.
- Tracey S., Todd J.A., Erwin D.H. 1993. Mollusca: Gastropoda. In *The fossil record* (pp. 131-167). Edited by M.J. Benton. London: Chapman and Hall.
- Troschel F.H. 1856-1893. Das Gebiss der Schnecken, zur Begründung einer natürlichen Classification. Berlin. 2 vols.
- Tunnicliffe V. 1992. The nature and origin of the modern hydrothermal vent fauna. *Palaos* 7: 338-350.
- Vaught K.C. 1989. Classification of the Living Mollusca. American Malacologists, Inc. Melbourne Florida, 189 pp.
- Vinther, J., Sperling, E.A., Briggs, D.E.G., Peterson, K.J. 2012 A molecular palaeobiological hypothesis for the origin of aplacophoran molluscs and their derivation from chiton-like ancestors. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279: 1259-1268.
- Vinther, J. 2015. The origins of molluscs. *Palaeontology*, 58(1), 19-34.
- Wägele, J., Letsch, H., Klussmann-Kolb, A., Mayer, C., Misof, B., Wägele, H. 2009 Phylogenetic support values are not necessarily informative: the case of the Serialia hypothesis (a mollusk phylogeny). *Frontiers in Zoology*, 6: 12.
- Wagner P.J. 1995. Testing evolutionary constraint hypotheses with early Paleozoic gastropods. *Paleobiology*, 21: 248-272.
- Wagner, P.J. 1999. Phylogenetics of the earliest anisostrophically coiled gastropods. *Smithsonian Contributions to Paleobiology* 88: 1-132.

- Wagner P.J. 2001. Gastropod Phylogenetics: progress, problems, and implications. *Journal of Paleontology*, 75(6): 1128-1140.
- Warén A. 1993. New and little known mollusca from Iceland and scandinavia. Part. 2. *Sarsia*, 78: 159-201. Warén A, Bouchet P. 2001. Gastropoda and Monoplacophora from hydrothermal vents and seeps; new taxa and records. *Veliger* 44: 116-231.
- Warén A, Gofas S, Schander C. 1993. Systematic position of three European heterobranch gastropods. *The Veliger* 36: 1-15.
- Warén A., Ponder, W.F. 1991. New species, anatomy, and systematic position of the hydrothermal vent and hydrocarbon seep gastropod family Provannidae fam. n. (Caenogastropoda). *Zoologica Scripta* 20, 27-56.
- Wenz W. 1938. Gastropoda. Bonntreager, Berlin, 240 p.
- White T.R., Conrad M.M., Tseng R., Balayan S., Golding R., Martins A.M.D., Dayrat B.A. 2011. Ten new complete mitochondrial genomes of pulmonates (Mollusca: Gastropoda) and their impact on phylogenetic relationships. *BMC Evolutionary Biology* 11(295): 115.
- Williams S.T., Foster P.G., Littlewood D.T.J., 2014. The complete mitochondrial genome of a turbinid vetigastropod from MiSeq Illumina sequencing of genomic DNA and steps towards a resolved gastropod phylogeny. *Gene* 533, 38-47.
- Wilson, N.G., Rouse, G.W., Giribet, G. 2010 Assessing the molluscan hypothesis Serialia (Monoplacophora + Polyplacophora) using novel molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 187-193.
- Wingstrand K.G. 1985. On the anatomy and relationships of Recent Monoplacophora. *Galathea Report* 16: 7-94.
- Winnepenninckx B., Steiner G., Backeljau T., De Wachter R. 1998. Details of gastropod phylogeny inferred from 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 55-63.
- Wolstenholme D.R. 1992. Animal mitochondrial genome: structure and evolution. *International Review of Cytology*, 141: 172-216.
- Yang Z., Rannala B. 2006 Bayesian estimation of species divergence times under a molecular clock using multiple fossil calibrations with soft bounds. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 212-226.
- Zapata F., Wilson N.G., Howison M., Andrade S.C.S., Jörgen K.M., Schrödl M., Goetz F.E., Giribet G., Dunn C.W., 2014. Phylogenomic analyses of deep gastropod relationships reject Orthogastropoda. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 281: 20141739.
- Zeng, T., Yin, W., Xia, R., Fu, C., Jin, B. 2014 Complete mitochondrial genome of a freshwater snail, *Semisulcospira libertine* (Cerithioidea: Semisulcospiridae). *Mitochondrial DNA*.
- Zou, S., Li, Q., Kong, L. 2011. Additional gene data and increased sampling give new insights into the phylogenetic relationships of Neogastropoda, within the caenogastropod phylogenetic framework. *Molecular phylogenetics and evolution*, 61(2), 425-435.

A decorative horizontal band at the bottom of the page featuring a vibrant green, wavy, textured pattern that resembles water or a digital signal.

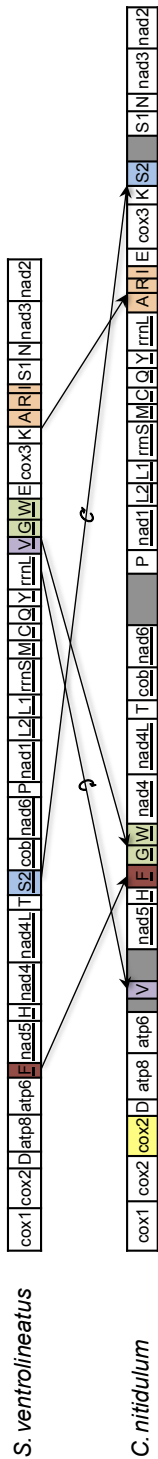
7. Apéndice

7. APÉNDICES

7.1 RESUMEN DE LOS PRINCIPALES CLADOS Y GRUPOS DE GASTERÓPODOS(BOUCHET Y ROCROI, 2005)

- Moluscos paleozoicos de posición incierta
- **Clado** Patellogastropoda
- **Clado** Vetigastropoda
- **Clado** Cocculiniformia
- **Clado** Neritimorpha
 - Neritimorpha paleozoicos de posición incierta
 - **Clado** † Cyrtoneritimorpha
 - **Clado** Cycloneritimorpha
- **Clado** Caenogastropoda
 - Caenogastropoda de posición incierta
 - *Grupo informal* Architaenioglossa
 - **Clado** Sorbeoconcha
 - **Clado** Hypsogastropoda
 - **Clado** Littorinimorpha
 - *Grupo informal* Ptenoglossa
 - **Clado** Neogastropoda
- **Clado** Heterobranchia
 - *Grupo informal* Nedere Heterobranchia
 - *Grupo informal* Opisthobranchia
 - **Clado** Cephalaspidea
 - **Clado** Thecosomata
 - **Clado** Gymnosomata
 - **Clado** Aplysiomorpha
 - *Grupo* Acochlidia
 - **Clado** Sacoglossa
 - *Grupo* Cyndrobullida
 - **Clado** Umbraculida
 - **Clado** Nudipleura
 - **Clado** Pleurobranchomorpha
 - **Clado** Nudibranchia
 - **Clado** Euctenidiacea
 - **Clado** Dexiarchia
 - **Clado** Pseudoeuctenidiacea
 - **Clado** Cladobranchia
 - **Clado** Euarminida
 - **Clado** Dendronotida
 - **Clado** Aeolidida
 - *Grupo informal* Pulmonata
 - *Grupo informal* Basommatophora
 - **Clado** Eupulmonata
 - **Clado** Systellommatophora
 - **Clado** Stylommatophora
 - **Clado** Elasmognatha
 - **Clado** Orthurethra
 - *Grupo informal* Sigmurethra

7.2 APÉNDICE PUBLICACIÓN 1



Appendix. Figure 1
Mitochondrial gene orders of *Scutopus ventrolineatus* and *Chaetoderma nitidulum*. Inversions (indicated by the circular arrows) and transpositions of protein coding, tRNA and rRNA genes are depicted among the two taxa. Genes encoded by the opposite strand are underlined. Genes located in apomorphic arrangements are colored. The biggest non coding regions (>300pb) are colored in grey. S1, S2, L1, and L2 designate genes for those tRNAs recognizing the codons AGN, UCN, CUN, and UUR, respectively.

Table 1. Complete mitochondrial genomes used in the phylogenetic analyses.

Taxon	Species	NCBI Accession No.	Reference
GASTROPODA			
HETEROBRANCHIA			
	Hygrophila: Planorbioidea		
	Nudipleura: Nudibranchia: Doridina		
	Nudipleura: Pleurobranchomorpha		
	Architectibranchia		
	Euopisthobranchia: Aplysiomorpha		
CAENO-GASTROPODA			
	Neogastropoda: Conoidea		
	Neogastropoda: Buccinoida		
	Littorinimorpha: Rissooidea		
VETIGASTROPODA			
PATELLOGASTROPODA			
NERITIMORPHA			
BIVALVIA			
	Unionoidea		
CEPHALOPODA			
	Decapodiformes: Sepiida		
	Decapodiformes: Teuthida		
	Octopodiformes: Octopoda		
	Nautiloidea		

POLYPLACOPHORA			
Chitonida	<i>Katharina tunicata</i>	NC_001636	Boore and Brown, 1994
SCAPHOPODA			
Dentaliidae	<i>Graptacme eborea</i>	NC_006162	Boore et al., 2004
CHAETODERMOMORPHA			
Chaetodermatida	<i>Chaetoderma nitidulum</i>	NC_013846	Dreyer and Steiner, 2010*
Limifossorimorpha	<i>Scutopus ventrolineatus</i>	KC_757645	This paper
ANNELIDA			
Scolecida; Maldanidae	<i>Clymenella torquata</i>	NC_006321	Jennings and Halanych, 2005
Terebellida; Terebellidae	<i>Pista cristata</i>	NC_011011	Zhong et al., 2008
NEMERTEA			
Heteronemertea	<i>Lineus viridis</i>	NC_012889	Podsiadlowski et al, 2009
BRACHIOPODA			
Terebratulida	<i>Terebratulina retusa</i>	NC_000941	Stechmann and Schlegel, 1999
PHORONIDA			
Phoronidae	<i>Phoronis psammophila</i>	AY368231	Helffenbein and Boore, 2004
ENTOPROCTA			
Loxosomatidae	<i>Loxosomella aloxiata</i>	NC_010432	Yokobori et al., 2008

* Unpublished

¹used only the combined data set

References

- Akasaki, T., Nikaído, M., Tsuchiya, K., Segawa, S., Hasegawa, M., Okada, N., 2006. Extensive mitochondrial gene arrangements in coleoid Cephalopoda and their phylogenetic implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38, 648-658.
- Boore, J., 2006. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Nautilus macromphalus* Mollusca: Cephalopoda. *BMC Genomics* 7, 182.
- Boore, J.L., Brown, W.M., 1994. Complete DNA Sequence of the Mitochondrial Genome of the Black Chiton, *Katharina tunicata*. *Genetics* 138, 20.
- Boore, J.L., Medina, M., Rosenberg, L.A., 2004. Complete Sequences of the Highly Rearranged Molluscan Mitochondrial Genomes of the Scaphopod *Graptacme eborea* and the Bivalve *Mytilus edulis*. *Mol. Biol. Evol.* 21.
- Castro, L.R., Colgan, D.J., 2010. The phylogenetic position of Neritimorpha based on the mitochondrial genome of *Nerita melanotragus* Mollusca: Gastropoda. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 918-923.
- Cunha, R., Grande, C., Zardoya, R., 2009. Neogastropod phylogenetic relationships based on entire mitochondrial genomes. *BMC Evol. Biol.* 9, 210.
- DeJong, R., Emery, A., Adema, C., 2004. The mitochondrial genome of *Biomphalaria glabrata* Gastropoda: Basommatophora, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 90, 991-997.
- Dreyer, H., Steiner, G., 2004. The complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the gadilid scaphopod *Siphonordentalium lobatum* Mollusca. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 605-617.
- Grande, C., Templado, J., Cervera, J.L., Zardoya, R., 2002. The complete mitochondrial genome of the nudibranch *Roboastrea europaea* Mollusca: Gastropoda supports the monophyly of opisthobranchs. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1672-1685.
- Heffenbein, K. G. and Boore, J. L., 2004. The mitochondrial genome of *Phoronis architecta*. Comparisons demonstrate that phoronids are lophotrochozoan protostomes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 153-157.
- Jennings, R.M., Halanych, K.M. 2005. Mitochondrial Genomes of *Clymenella torquata* (Maldanidae) and *Riftia pachyptila* (Siboglinidae): Evidence for conserved gene order in annelida. *Mol. Biol. Evol.* 22, 210-222
- Maynard, B., Kerr, L., McKiernan, J., Jansen, E., Hanna, P., 2005. Mitochondrial DNA sequence and gene organization in Australian backpack abalone *Haliotis rubra* leach. *Mar Biotechnol* NY 7, 645 - 658.
- Medina, M., Lal, S., Vallés, Y., Takaoka, T.L., Dayrat, B.A., Boore, J.L., Gosliner, T., 2011. Crawling through time: Transition of snails to slugs dating back to the Paleozoic, based on mitochondrial phylogenomics. *Mar. Genom.* 4, 51-59.
- Podsiadlowski, L., Braband, A., Struck, T.H., von Dohren, J. And Bartolomaeus, T., 2009. Phylogeny and mitochondrial gene order variation in Lophotrochozoa in the light of new mitogenomic data from Nemertea. *BMC Genomics* 10, 364.
- Simison, W., Lindberg, D., Boore, J., 2006. Rolling circle amplification of metazoan mitochondrial genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 562-567.
- Stechmann, A. and Schlegel, M., 1999. Analysis of the complete mitochondrial DNA sequence of the brachiopod *Terebratulina retusa* places Brachiopoda within the protostomes. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 266, 2043-2052.
- Tomita, K., Yokobori, S.-I., Oshima, T., Ueda, T., Watanabe, K., 2002. The Cephalopod *Loligo bleekeri* Mitochondrial Genome: Multiplied Noncoding Regions and Transposition of tRNA Genes. *J. Mol. Evol.* 54, 486-500.
- Yokobori, S.-i., Fukuda, N., Nakamura, M., Aoyama, T., Oshima, T., 2004. Long-Term Conservation of Six Duplicated Structural Genes in Cephalopod Mitochondrial Genomes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 2034-2046.
- Yokobori, S., Iseto, T., Asakawa, S., Sasaki, T., Shimizu, N., Yamagishi, A., Oshima, T. and Hirose, E. 2008. Complete nucleotide sequences of mitochondrial genomes of two solitary entoprocts, *Loxocorone allax* and *Loxosomella aloxiata*: implications for lophotrochozoan phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 612-628.
- Zhong, M., Struck, T.H. and Halanych, K.M. 2008. Phylogenetic information from three mitochondrial genomes of Terebelliformia (Annelida) worms and duplication of the methionine tRNA. *Gene* 416, 11-21.

Table 2. Fragments of nuclear ribosomal proteins used in phylogenetic analyses.

Taxon	Nuclear ribosomal proteins ¹															
	40S		60S													
	S8	S15	L3	L4	L5	L6	L8	L10a	L16_L10	L17	L18a	L32				
<i>Pleurobranchaea californica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Aplysia californica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Biomphalaria glabrata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Tritonia diomedea</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Helicoidea</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+				
<i>Ilyanassa obsoleta</i>	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+				
<i>Theodoxus fluviatilis</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+				
<i>Haliotis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Lotia gigantea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Dentaliidae</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+				
<i>Hyriopsis cumingii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+				
<i>Loligo</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Octopus vulgaris</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Nautilus</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Chitonida</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Scutopus ventrolineatus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+				
<i>Chaetoderma nitidulum</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Neomenia</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+				
<i>Wirenia argentea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Capitellidae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>Alvinella pompejana</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+				
<i>Carinoma</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+				
<i>Terebratalia transversa</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+				
<i>Pedicellina</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+				
No. Amino acids	204	134	244	221	246	151	244	197	203	121	280	117				

¹ Kocot, K.M., Cammon, J.T., Todt, C., Citarella, M.R., Kohn, A.B., Meyer, A., Santos, S.R., Schander, C., Moroz, L.L., Lieb, B., Halanaych, K.M., (2011) Phylogenomics reveals deep molluscan relationships. *Nature* 477: 452-456.

Table 3. Output of the Protein Partition Finder

Data set	Best Model	alpha	pinvar
MITO amino acids	best partition: per group (<i>atp</i>, <i>cox</i>, <i>cob</i>, <i>nad</i>); -lnL= 67264.29		
<i>atp</i>	mART	0.87281	
<i>cox</i>	LG	0.434848	
<i>cob</i>	mART	0.642182	
<i>nad</i>	mART	0.655589	
NUC amino acids	best partition: all genes separated; -lnL= 36866.21		
40S_S8	LG	0.81703	
40S_S15	JTT	0.675925	
60S_L3	LG	0.593494	
60S_L4	LG	0.705006	
60S_L5	LG	1.253	0.268898
60S_L6	LG	0.514199	
60S_L8	LG	0.530343	
60S_L10a	LG	1.154	0.265532
60S_L16_L10	LG	0.615296	0.241674
60S_L17	JTT	0.843745	0.157126
60S_L18a	Blosum62	1.049	
60S_L32	LG	0.864881	0.225493
Combined (MITO+NUC)	best partition: <i>atp</i>6/8 and <i>nad</i>4/4L, remaining separated; -lnL= 178340.19		
<i>atp</i> 6/8	mART	0.747941	
<i>cox</i> 1	LG	0.473613	
<i>cox</i> 2	mART	0.675584	
<i>cox</i> 3	mART	0.577307	
<i>cob</i>	mART	0.588785	
<i>nad</i> 1	mART	0.586762	
<i>nad</i> 2	mART	0.63904	
<i>nad</i> 3	mART	0.960463	
<i>nad</i> 4/4L	LG	0.631425	
<i>nad</i> 5	LG	0.487988	
<i>nad</i> 6	mART	0.764513	
40S_S8	LG	0.752367	
40S_S15	JTT	0.521373	
60S_L3	LG	0.555502	
60S_L4	LG	0.761228	
60S_L5	LG	0.610006	
60S_L6	LG	0.60341	
60S_L8	LG	0.462332	
60S_L10a	LG	0.504528	
60S_L16_L10	LG	0.372527	
60S_L17	LG	0.440494	
60S_L18a	Blosum62	0.959612	
60S_L32	LG	0.41837	

7.3 APÉNDICE PUBLICACIÓN 2

MITO (aa)		-LnL									
Scheme Name: groups per function		RAxML	MrBayes								
		53530,0514	61920,16								
Subset	Best Model	Subset Partitions	alpha pinvar								
1	MtArt+G	ATP6, ATP8	1,04E+00								
2	LG+I+G+F	COX1, COX2, COX3	7,34E-01								
3	MtArt+H+G+F	CYTB	1,46E+00								
4	MtArt+H+G+F	ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6	1,51E+00								
			1,88E-01								
Nuclear (nt)											
Scheme Name: Separated		7530,36363	7652,523								
Subset	Best Model	Subset Partitions	alpha pinvar								
1	TIME+G	18S	4,07E-01								
2	TrN+G	28S_d1	3,37E-01								
3	TrN+G	28S_d6	5,31E-01								
4	GTR+H+G	H3	7,11E-01								
			6,28E-01								
MITO (aa) + Nuclear (nt)											
Scheme Name: groups per function + separated		61607,4001	70007,973								
		r(A<->C)	r(A<->G)	r(A<->T)	r(C<->G)	r(C<->T)	r(G<->T)	pi(A)	pi(C)	pi(G)	pi(T)
		1,28E-01	1,93E-01	5,78E-02	1,08E-01	4,13E-01	1,00E-01	2,68E-01	2,46E-01	2,68E-01	2,19E-01
		4,83E-02	1,62E-01	1,16E-01	8,10E-02	4,93E-01	9,96E-02	2,19E-01	2,64E-01	3,30E-01	1,87E-01
		8,43E-02	1,52E-01	8,99E-02	9,76E-02	5,09E-01	6,76E-02	2,28E-01	2,56E-01	3,45E-01	1,72E-01
		1,44E-01	2,90E-01	2,45E-01	1,77E-02	2,84E-01	1,92E-02	2,45E-01	3,13E-01	1,81E-01	2,60E-01

7.4 APÉNDICE PUBLICACIÓN 3

1. Strategy for PCR amplification and sequencing of caenogastropod complete mitochondrial genomes

- *Columbella adansoni*

- Complete

1) Standard PCRs: *cob* and *cox3* (Boore and Brown, 2000)

2) Design of specific primers:

CaCob.F: 5'-agtggaatgggtatgaggaggatttgcg-3'

CaCob.R: 5'-accgcaaactcctcatatccattcca-3'

CaCOX3.F: 5'-tcatacaattcaggtgtcaaagggggttcg-3'

CaCOX3.R: 5'-cagttgctagaagccctgtaggcca-3'

3) Long PCRs:

CaCob.F>CACOX3.R	4000 bp	98°/30" (98°/10" - 57°/30" - 68°/12")*45 68°/10'
CaCOX3.F>CACob.R	+10000 bp	98°/30" (98°/10" - 57°/30" - 68°/12")*45 68°/10'

-Illumina sequencing of the CACob.F-CACOX3.R fragment failed and the following primers were used for nested PCR:

CaCobc.F: 5'-agtaggggtcgattgccatcctgt-3'

CaEnd5a.R: 5'-ttgggctgaaataggagct-3'

CaEnd5.F: 5'-agctcctatttcagcccaa-3'

CaCOX3.R (see above)

Coadnad5F 5'-ggcaacctcaatttaagattagctgc-3'

Coadcox3R 5'-ctttgacacctgaattgtatgaaatccc-3'

CaCobc.F>CAEnd5a.R	3000 bp	94°/60" (98°/10" - 57°/30" - 68°/4")*45 68°/10'
CaEnd5.F>CACOX3.R	1500 bp	94°/60" (98°/10" - 57°/30" - 68°/4")*45 68°/10'
Coadnad5F>Coadcox3R	1600 bp	94°/60" (98°/10" - 53°/30" - 68°/4")*45 68°/12'

-Primer walking:

ND4_seq.F: 5'-tccgagggaaatgattacgtgtctagt-3'

Cob_seq.F: 5'-aggatatgggatcttgcgtcta-3'

ND5_seq.R: 5'-caatcccagccattagca-3'

ND5_seq2.R: 5'-agttatcctgcaagaactcaactc-3'

P1CAF-UJ: 5'-aaagataagagcatagcactgaagatgc-3'

P2CAR-UJ: 5'-atcactacatggttactacatccagc-3'

Erosaria spurca

- Nearly complete (missing 3000 bp between *cob* and *cox3*)

1) **Standard PCRs:** *cob* and *cox3* (Boore and Brown, 2000); *cox1* (Folmer et al, 1994)

2) **Design of specific primers:**

EsCOX1.F: 5'-tccctgccagtttagctggggct-3'

EsCob.R: 5'-gatggagagaaagtgccattccacgct-3'

EsCOX3.F: 5'-ccaagtctctaaaggactccggtgagga-3'

EsCOX1.R: 5'-tgggcaatgtttcccgttaaagg-3'

3) **Long PCRs:**

EsCOX1.F>EsCob.R	8000-10000 bp	98°/30" (98°/10" - 57°/30" - 68°/12')*45 68°/10'
EsCOX3.F>EsCOX1.R	3000-4000 bp	98°/30" (98°/10" - 57°/30" - 68°/12')*45 68°/10'

- Large fragment was sequenced with Illumina. Short fragment was sequenced through primer walking:

EsCOX3a.F: 5'-acagaagcctagcccctacgccagaatt-3'

EsCOX3a.R: 5'-atgatgccccgctcgagaagtgtctg-3'

Esnad2.R: 5'-gccaaaaattaggagacttgacccagc-3'

Es_tSer.R: 5'-agttagcagccctgcttactccaagtt-3'

Es_tArg.R: 5'-tgaagaaggactctaccgccaaggta-3'

- *Natica hebraeus*

- Complete

1) **Standard PCRs:** *nad4* (Shao et al., 2006); *rrnL* (Palumbi, 1996); *cox1* ((Folmer et al, 1994)

2) **Design of specific primers:**

NhCOX1.F: 5'-tgattggtgggttgggaa-3'

Nh16S.R: 5'-tcagggtaccgcgccggtgaat-3'

Nh16S.F: 5'-gcggtaccctgaccgtgcaa-3'

Nhnd4.R: 5'-ccagcttgtaaactgctccggtga-3'

Nhnd4.F: 5'-gctatcaaccggaacgtttacaagctgga-3'

NhCOX1.R: 5'-gctcctaaaattgaagaagcaccagct-3'

3) **Long PCRs:**

NhCOX1.F>Nh16S.R	5000 bp	98°/30" (98°/10" - 55°/30" - 68°/7')*45 68°/10'
Nh16S.F>Nhnd4.R	4000-5000 bp	98°/30" (98°/10" - 63°/30" - 68°/7')*45 68°/10'
Nhnd4.F>NhCOX1.R	5000-6000 bp	98°/30" (98°/10" - 60°/30" - 68°/7')*45 68°/10'

- Full sequencing with Illumina

- *Cochlostoma hidalgoi*

1) **Standard PCRs:** *cob* and *cox3* (Boore and Brown, 2000); *cox1* (Folmer et al, 1994)

2) **Design of specific primers:**

ChCOX1.F: 5'-gcccctgatatagctttccgcgcttaa-3'

ChCob.R: 5'-tcgacagcaaagccaccccaaact-3'

ChCob.F: 5'-agtttggggtggcttgctgtcga-3'

ChCOX3.R: 5'-gcaagaacctaatcaaccctaggcgcg-3'

ChCOX3.F: 5'-tgagcatatttcataggagcctcgcg-3'

ChCOX1.R: 5'-aaagcacaggatctccaccaccagct-3'

3) **Long PCRs:**

ChCOX1.F>ChCob.R	8000-10000 bp	98°/30" (98°/10" - 59°/30"- 68°/12')*45 68°/10'
ChCob.F>ChCOX3.R	5000-6000 bp	98°/30" (98°/10" - 57°/30"- 68°/12')*45 68°/10'
ChCOX3.F>ChCOX1.R	3000-4000 bp	98°/30" (98°/10" - 57°/30"- 68°/12')*45 68°/10'

- Shotgun sequencing plus nested PCRs:

Chnd1.F: 5'-tatgctgagggtggctttgc-3'

ChCob.R: 5'-tcgacagcaaagccaccccaaact-3'

Chnd5.F: 5'-agagtttcccttacggtact-3'

ChCOX3a.R: 5'-acctcaacgtaatccgctggctacc-3'

Chnd5_def.F: 5'-ttagaccacggctgacttga-3'

ChCOX3b.R: 5'-cgtaagaccatgtagtcaacctgc-3'

Chnd1.F>ChCob.R	94°/60" (98°/10" - 57°/30"- 68°/4')*45 68°/5'
Chnd5.F>ChCOX3a.R	98°/30" (98°/10" - 57°/30"- 68°/2')*45 68°/5'
Chnd5_def.F>ChCOX3b.R	98°/30" (98°/10" - 57°/30"- 68°/2')*45 68°/3'

- And primer walking:

ChCOX2.F: 5'-tcccacaagcgacctcagaagcg-3'

Ch12Sb.R: 5'-tcattcttcgacgagagcga-3'

ChATP6.F: 5'-gtgaggatatcacaagtactcaga-3'

ChND5_def2.F: 5'-aatggccttgaagtcgt-3'

- *Galeodea echinophora*

- Complete

1) **Standard PCRs:** *rrnS* (Kocher et al., 1989); *cox1* (Folmer et al., 1994); *cob* (Boore and Brown, 2000)

2) Design of specific primers:

GeCOX1.F: 5'-ttccttaccggtattagctggagctattactat-3'
Ge12S.R: 5'-acctttatataggctgcaccttgatctgacg-3'

Ge12S.F: 5'-acctgtctcataatcgacaatccgcgttacacc-3'
GeCob.R: 5'-ggaactttctcaccgtcgctatttaatcccag-3'

GeCob.F: 5'-ttgaggagggttcgctattgataacgcaactct-3'
GeCOX1.R: 5'-tcaacagatcctccgcatgagctagattacc-3'

3) Long PCRs:

GeCOX1.F>Ge12S.R	3000-4000 bp	94°/1' (98°/10' '- 68°/12')*40 72°/10'
Ge12S.F>GeCob.R	3500-4000 bp	94°/1' (98°/10' '- 68°/12')*40 72°/10'
GeCob.F>GeCOX1.R	8000-10000 bp	94°/1' (98°/10' '- 68°/12')*40 72°/10'

- Shotgun sequencing plus nested PCRs:

GeATP6.F: 5'-aatctcagccaccaaca-3'
Genad1.R: 5'-caattgctcgtagctctcc-3'

Ge16S.F: 5'-aggctctgaaacatgcac-3'
Genad1.R: 5'-caattgctcgtagctctcc-3'

GeCOX3.F: 5'-ggcatcatttggcttgaagcag-3'
GeCOX1a.R: 5'-tcgtctcctagtaaagctccagggtga-3'

Gend4.F: 5'-gcatgtgaagcaagtctcgg-3'
Gend5a.R: 5'-taaagagccagcgcatcaa-3'

GeATP6.F>Genad1.R	94°/60" (98°/10" - 62°/30" - 68°/4')*45 68°/5'
Ge16.F>Genad1.R	94°/60" (98°/10" - 62°/30" - 68°/3')*45 68°/5'
GeCOX3.F>GeCOX1a.R	94°/60" (98°/10" - 62°/30" - 68°/4')*45 68°/5'
GeND4.F>GeND5a.R	94°/60" (98°/30" - 57°/30" - 68°/4')*45 68°/5'

- And primer walking:

Gecoba_int.F: 5'-cggtgagaaagttccatttcattgc-3'
Gend5def.F: 5'-actgtagcagcatcattgc-3'
Gend5def.R: 5'-tgacttaatgtggatagcgc-3'

2. Annotation of the new caenogastropod mitochondrial genomes

<i>Cochlostoma hidalgoi</i>				
Gene		Position	Strand	Length (pb)
		From-To		
<i>cox1</i>		1-1539	+	1539
<i>cox2</i>		1543-2229	+	687
<i>atp8</i>		2296-2463	+	168
tRNA-Asp	D - GUC	2480-2547	+	
<i>atp6</i>		2551-3263	+	713
tRNA-Met	M - CAU	3336-3270	-	
tRNA-Gln	Q - UUG	3402-3339	-	
tRNA-Gly	G - UCC	3466-3404	-	
tRNA-Cys	C - GCA	3531-3472	-	
tRNA-Trp	W - UCA	3597-3533	-	
tRNA-Tyr	Y - GUA	3663-3600	-	
tRNA-Glu	E - UUC	3737-3674	-	
<i>12S</i>		3738-4699	+	962
tRNA-Val	V - UAC	4700-4765	+	
<i>16S</i>		4766-6081	+	1316
tRNA-Leu	L - UAG	6082-6147	+	
tRNA-Leu	L - UAA	6165-6231	+	
<i>nad1</i>		6232-7167	+	939
tRNA-Pro	P - UGG	7169-7237	+	
<i>nad6</i>		7238-7750	+	512
<i>cob</i>		7743-8880	+	1140
tRNA-Ser	S - UGA	8881-8946	+	
<i>nad4l</i>		9003-9293	+	291
<i>nad4</i>		9287-10654	+	1367
tRNA-His	H - GUG	10658-10726	+	
<i>nad5</i>		10727-12440	+	1713
tRNA-Phe	F - GAA	12459-12525	+	
tRNA Thr	T - UGU	12544-12607	+	
<i>cox3</i>		12856-13635	+	780
tRNA-Lys	K - UUU	13662-13734	+	
tRNA-Ala	A - UGC	13753-13817	+	
tRNA-Arg	R - UCG	13827-13895	+	
tRNA-Asn	N - GUU	13894-13959	+	
tRNA-Ile	I - GAU	13960-14028	+	
<i>nad3</i>		14029-14382	+	354
tRNA-Ser	S - GCU	14388-14454	+	
<i>nad2</i>		14455-15528	+	1074

<i>Naticarius hebraeus</i>				
Gene		Position	Strand	Length (pb)
		From-To		
<i>cox1</i>		1-1536	+	1536
<i>cox2</i>		1553-2239	+	687
tRNA-Asp	D - GUC	2245-2312	+	
<i>atp8</i>		2314-2472	+	159
<i>atp6</i>		2475-3170	+	696
tRNA-Met	M - CAU	3269-3203	-	
tRNA-Tyr	Y - GUA	3342-3273	-	
tRNA-Cys	C - GCA	3408-3343	-	
tRNA-Trp	W - UCA	3475-3410	-	
tRNA-Gln	Q - UUG	3537-3477	-	
tRNA-Gly	G - UCC	3613-3545	-	
tRNA-Glu	E - UUC	3687-3621	-	
<i>12S</i>		3688-4658	+	971
tRNA-Val	V - CAC	4659-4726	+	
<i>16S</i>		4727-6158	+	1432
tRNA-Leu	L - UAA	6159-6226	+	
tRNA-Leu	L - UAG	6232-6300	+	
<i>nad1</i>		6301-7222	+	922
tRNA-Pro	P - UGG	7245-7312	+	
<i>nad6</i>		7314-7807	+	493
<i>cob</i>		7824-8963	+	1140
tRNA-Ser	S - UGA	8971-9037	+	
tRNA Thr	T - UGU	9123-9056	-	
<i>nad4l</i>		9131-9427	+	297
<i>nad4</i>		9421-10794	+	1374
tRNA-His	H - GUG	10801-10867	+	
<i>nad5</i>		10868-12569	+	1702
tRNA-Phe	F - GAA	12592-12658	+	
<i>cox3</i>		12692-13495	+	804
tRNA-Lys	K - UUU	13520-13591	+	
tRNA-Ala	A - UGC	13596-13662	+	
tRNA-Arg	R - UCG	13678-13746	+	
tRNA-Asn	N - GUU	13748-13817	+	
tRNA-Ile	I - GAU	13827-13897	+	
<i>nad3</i>		13898-14250	+	353
tRNA-Ser	S - GCU	14251-14320	+	
<i>nad2</i>		14320-15381	+	1062

Galeodea echinophora					
Gene		Position	Strand	Codon	Length (pb)
		From-To		Start/Stop	
cox1		1-1536	+	ATG/TAA	1536
cox2		1557-2241	+	ATG/T--	687
tRNA-Asp	D - GUC	2242-2309	+		
atp8		2310-2468	+	ATG/TAA	159
atp6		2474-3169	+	ATG/TAA	696
tRNA-Met	M - CAU	3277-3210	-		
tRNA-Tyr	Y - GUA	3363-3297	-		
tRNA-Cys	C - GCA	3448-3383	-		
tRNA-Trp	W - UCA	3514-3449	-		
tRNA-Gln	Q - UUG	3578-3514	-		
tRNA-Gly	G - UCC	3647-3580	-		
tRNA-Glu	E - UUC	3718-3648	-		
12S		3719-4687	+		969
tRNA-Val	V - CAC	4688-4755	+		
16S		4756-6147	+		1392
tRNA-Leu	L - UAG	6148-6216	+		
tRNA-Leu	L - UAA	6218-6286	+		
nad1		6287-7228	+	ATG/TAG	942
tRNA-Pro	P - UGG	7229-7297	+		
nad6		7299-7799	+	ATG/TAA	501
cob		7807-8946	+	ATG/TAG	1140
tRNA-Ser	S - UGA	8952-9016	+		
tRNA Thr	T - UGU	9088-9017	-		
nad4l		9097-9393	+	ATG/TAG	297
nad4		9387-10760	+	ATG/TAA	1373
tRNA-His	H - GUG	10774-10838	+		
nad5		10839-12560	+	ATG/TAA	1721
tRNA-Phe	F - GAA	12561-12630	+		
cox3		12686-13465	+	ATG/TAA	780
tRNA-Lys	K - UUU	13481-13554	+		
tRNA-Ala	A - UGC	13579-13646	+		
tRNA-Arg	R - UCG	13658-13726	+		
tRNA-Asn	N - GUU	13728-13795	+		
tRNA-Ile	I - GAU	13824-13893	+		
nad3		13898-14251	+	ATG/TAA	354
tRNA-Ser	S - GCU	14256-14323	+		
nad2		14324-15382	+	ATG/TAA	1059

<i>Erosaria spurca</i>				
Gene		Position	Strand	Length (pb)
		From-To		
<i>cox1</i>		2484-4022	+	1539
<i>cox2</i>		4048-4734	+	687
tRNA-Asp	D - GUC	4743-4811	+	
<i>atp8</i>		4813-4971	+	159
<i>atp6</i>		4976-5671	+	696
tRNA-Met	M - CAU	5775-5708	-	
tRNA-Tyr	Y - GUA	5844-5777	-	
tRNA-Cys	C - GCA	5920-5851	-	
tRNA-Trp	W - UCA	5987-5921	-	
tRNA-Gln	Q - UUG	6050-5988	-	
tRNA-Gly	G - UCC	6121-6055	-	
tRNA-Glu	E - UUC	6193-6123	-	
<i>12S</i>		6194-7161	+	968
tRNA-Val	V - CAC	7162-7231	+	
<i>16S</i>		7232-8633	+	1402
tRNA-Leu	L - UAG	8634-8702	+	
tRNA-Leu	L - UAA	8706-8775	+	
<i>nad1</i>		8777-9718	+	942
tRNA-Pro	P - UGG	9719-9785	+	
<i>nad6</i>		9787-10290	+	504
<i>cob</i>		10296-11105	+	
tRNA-Ser	S - UGA	---		
tRNA Thr	T - UGU	---		
<i>nad4l</i>		---		---
<i>nad4</i>		---		---
tRNA-His	H - GUG	---		
<i>nad5</i>		---		---
tRNA-Phe	F - GAA	---		
<i>cox3</i>		1-600*(250pb absent)	+	---
tRNA-Lys	K - UUU	622-689	+	
tRNA-Ala	A - UGC	691-759	+	
tRNA-Arg	R - UCG	764-832	+	
tRNA-Asn	N - GUU	843-912	+	
tRNA-Ile	I - GAU	919-987	+	
<i>nad3</i>		993-1346	+	354
tRNA-Ser	S - GCU	1347-1414	+	
<i>nad2</i>		1415-2476	+	1059

<i>Columbella adansoni</i>				
Gene		Position	Strand	Length (pb)
		From-To		
<i>cox1</i>		1-1533	+	ATG/TAG 1533
<i>cox2</i>		1567-2253	+	ATG/TAA 687
tRNA-Asp	D - GUC	2258-2325	+	
<i>atp8</i>		2326-2484	+	ATG/TAA 159
<i>atp6</i>		2495-3190	+	ATG/TAA 696
tRNA-Met	M - CAU	3227-3293	-	
tRNA-Tyr	Y - GUA	3299-3366	-	
tRNA-Cys	C - GCA	3367-3430	-	
tRNA-Trp	W - UCA	3431-3497	-	
tRNA-Gln	Q - UUG	3498-3559	-	
tRNA-Gly	G - UCC	3563-3630	-	
tRNA-Glu	E - UUC	3631-3695	-	
<i>12S</i>		3696-4650	+	955
tRNA-Val	V - CAC	4651-4719	+	
<i>16S</i>		4720-6067	+	1348
tRNA-Leu	L - UAG	6068-6136	+	
tRNA-Leu	L - UAA	6137-6205	+	
<i>nad1</i>		6206-7145	+	ATG/T-- 940
tRNA-Pro	P - UGG	7146-7214	+	
<i>nad6</i>		7216-7716	+	ATG/TAA 501
<i>cob</i>		7719-8858	+	ATG/TAA 1140
tRNA-Ser	S - UGA	8865-8929	+	
tRNA Thr	T - UGU	8933-9000	-	
<i>nad4l</i>		9013-9309	+	ATG/TAG 297
<i>nad4</i>		9303-10674	+	ATG/T-- 1377
tRNA-His	H - GUG	10675-10740	+	
<i>nad5</i>		10741-12462	+	ATG/TAA 1721
tRNA-Phe	F - GAA	12470-12538	+	
<i>cox3</i>		13632-14411	+	ATG/T-- 774
tRNA-Lys	K - UUU	14427-14492	+	
tRNA-Ala	A - UGC	14512-14578	+	
tRNA-Arg	R - UCG	14580-14648	+	
tRNA-Asn	N - GUU	14651-14719	+	
tRNA-Ile	I - GAU	14721-14788	+	
<i>nad3</i>		14789-15142	+	ATG/TAA 354
tRNA-Ser	S - GCU	15143-15210	+	
<i>nad2</i>		15211-16269	+	ATG/TAA 1059

3. Partitions and model selection

MITO			Scheme Name: all separated excep ATP6/8 ND4/L											
Subset	Best Model	Subset Partitions	alpha	pinvar	r(A<->C)	r(A<->G)	r(A<->T)	r(C<->G)	r(C<->T)	r(G<->T)	pi(A)	pi(C)	pi(G)	pi(T)
1	MTart+G+F	ATP6/8	6.16E-01											
2	MTart+H+G+F	COX1	2.92E-01	4.51E-01										
3	mtREV+H+G+F	COX2	5.84E-01	8.71E-02										
4	CpREV+G+F	COX3	5.25E-01											
5	MTart+H+G+F	CYTB	7.30E-01	2.24E-01										
6	MTart+H+G	ND1	4.91E-01											
7	JTT+G+F	ND2	7.49E-01											
8	MTart+H+G	ND3	7.02E-01	1.73E-01										
9	MTart+H+G	ND4/L	1.00E+00	2.08E-01										
10	MTart+H+G	ND5	7.86E-01	2.14E-01										
11	MTart+H+G	ND6	9.09E-01	1.21E-01										
Nuclear			Scheme Name: Grouped 28Sd1/d6 28SA/B											
Subset	Best Model	Subset Partitions	alpha	pinvar	r(A<->C)	r(A<->G)	r(A<->T)	r(C<->G)	r(C<->T)	r(G<->T)	pi(A)	pi(C)	pi(G)	pi(T)
1	TrNef+G	18S	2.84E-01		1.23E-01	1.78E-01	1.05E-01	5.30E-02	4.54E-01	8.73E-02	2.59E-01	2.45E-01	2.57E-01	2.39E-01
2	TrN+G	28Sd1_d6	2.11E-01		7.21E-02	1.12E-01	1.16E-01	7.44E-02	5.16E-01	1.09E-01	2.45E-01	2.44E-01	3.37E-01	1.74E-01
3	LG+G	H3	8.23E-01											
4	GTR+G	28SA_B	3.75E-02		1.27E-01	1.48E-01	2.78E-02	4.06E-02	5.62E-01	9.50E-02	2.55E-01	2.30E-01	2.60E-01	2.55E-01
MITO + Nuclear			Scheme Name: Separated Mito + Grouped 28Sd1/d6 28SA/B											
Subset	Best Model	Subset Partitions	alpha	pinvar	r(A<->C)	r(A<->G)	r(A<->T)	r(C<->G)	r(C<->T)	r(G<->T)	pi(A)	pi(C)	pi(G)	pi(T)
1	MTart+G+F	ATP6	7.71E-01											
2	MTart+G+F	ATP8	1.14E+00											
3	MTart+H+G+F	COX1	2.60E-01	2.76E-01										
4	mtREV+H+G+F	COX2	8.16E-01	1.71E-01										
5	CpREV+G+F	COX3	6.10E-01											
6	MTart+H+G+F	CYTB	7.54E-01	2.00E-01										
7	MTart+H+G	ND1	7.81E-01	1.05E-01										
8	JTT+G+F	ND2	9.07E-01											
9	MTart+H+G	ND3	9.69E-01	1.36E-01										
10	MTart+H+G	ND4	1.08E+00	2.01E-01										
11	MTart+H+G	ND4L	1.44E+00	4.66E-02										
12	MTart+H+G	ND5	9.24E-01	2.09E-01										
13	MTart+H+G	ND6	1.31E+00	1.13E-01										
14	TrNef+G	18S	2.73E-01		9.87E-02	1.74E-01	1.06E-01	6.73E-02	4.26E-01	1.28E-01	2.64E-01	2.56E-01	2.59E-01	2.21E-01
15	TrN+G	28Sd1_d6	2.06E-01		7.79E-02	1.64E-01	7.64E-02	8.71E-02	5.00E-01	9.38E-02	2.32E-01	2.49E-01	2.99E-01	2.20E-01
16	GTR+G	28SA_B	4.03E-02		1.20E-01	2.57E-01	2.50E-02	4.08E-02	4.51E-01	1.06E-01	2.56E-01	2.29E-01	2.62E-01	2.53E-01
16	LG+G	H3	7.98E-01											

